

# ACTA

## PHARMACEUTICA HUNGARICA

A Magyar Gyógyszerésztudományi Társaság tudományos folyóirata

# 1.

## 2014

APHGAO 84, (043) 1–52. (2014)





# ACTA PHARMACEUTICA HUNGARICA

A Magyar Gyógyszerésztudományi Társaság folyóirata

*Főszerkesztő:*

Noszál Béla, Semmelweis Egyetem, Gyógyszerészi Kémiai Intézet  
1092 Budapest, Hőgyes E. u. 9.  
Tel.: 217-0891;  
E-mail: nosbel@hogyes.sote.hu

*Felelős szerkesztő:*

Zelkó Romána, Semmelweis Egyetem, Egyetemi Gyógyszertár,  
Gyógyszerügyi Szervezési Intézet,  
1092 Budapest, Hőgyes E. u. 7–9.  
Tel.: 217-0927;  
E-mail: zelrom@hogyes.sote.hu

*A szerkesztőbizottság tagjai:*

Báthori Mária, Erős István, Gunda Tamás, Perjési Pál,  
Tóthfalusi László

*A szerkesztőség címe – Correspondence:*

Acta Pharmaceutica Hungarica  
1092 Budapest, Hőgyes Endre u. 9.

*A főszerkesztő munkatársa:*

Hankó Zoltán MGYT,  
1085 Budapest, Gyulai Pál u. 16.  
Tel.: 235-0999; fax: 235-0998

---

## TARTALOM

<i>Dr. Tóth Klára (1939–2013)</i> .....	3
<i>Dr. Laszlovszky József (1923 – 2014)</i> .....	4
<i>Katona Gábor, Jójátrné Laczkovich Orsolya És Szabóné Révész Piroska: A trehalóz, mint amorfizálódásra hajlamos segédanyag, rekrisztallizációjának vizsgálata.</i> .....	7
<i>Kálmán Noémi, Magyarné-Jeszenszki Erzsébet, Kurtán Tibor és Antus Sándor: Újabb adatok izovanillin típusú molekulák édes ízének molekuláris hátteréről.</i> .....	15
<i>Tóth Gergő, Noszál Béla: Pajzsmirigyhormonok és előanyagaik. II. Részecske-specifikus tulajdonságok</i> .....	21
<i>Pák Krisztián, Kiss Zsuzsanna, Erdei Tamás, Képes Zita, Gesztelyi Rudolf: Új lehetőség farmakológiai agonisták receptorközelbeli koncentrációjának becslésére: a receptoriális válaszkészség módszer (RRM)</i> .....	38

## CONTENTS

<i>Dr. Tóth Klára (1939–2013)</i> . . . . .	3
<i>Dr. Laszlovszky József (1923 – 2014)</i> . . . . .	4
<i>Katona, G., Jójárt-Laczovich, O., Szabó-Révész, P.: Investigation of the recrystallization of trehalose as a good glass-former excipient</i> . . . . .	7
<i>Kálmán, N., Magyarné-Jeszenszki, E., Kurtán T. and Antus S.: New facts about the molecular background of isovanilline-type sweeteners</i> . . . . .	15
<i>Tóth, G., Noszál, B.: Thyroid hormones and their precursors. II. Species-specific properties</i> . . . . .	21
<i>Pak K, Kiss Z, Erdei T, Kepes Z, Gesztelyi R: The receptorial responsiveness method (RRM), a new possibility to estimate concentration of pharmacological agonists at their receptors</i> . . . . .	38



## Dr. Tóth Klára 1939 – 2013

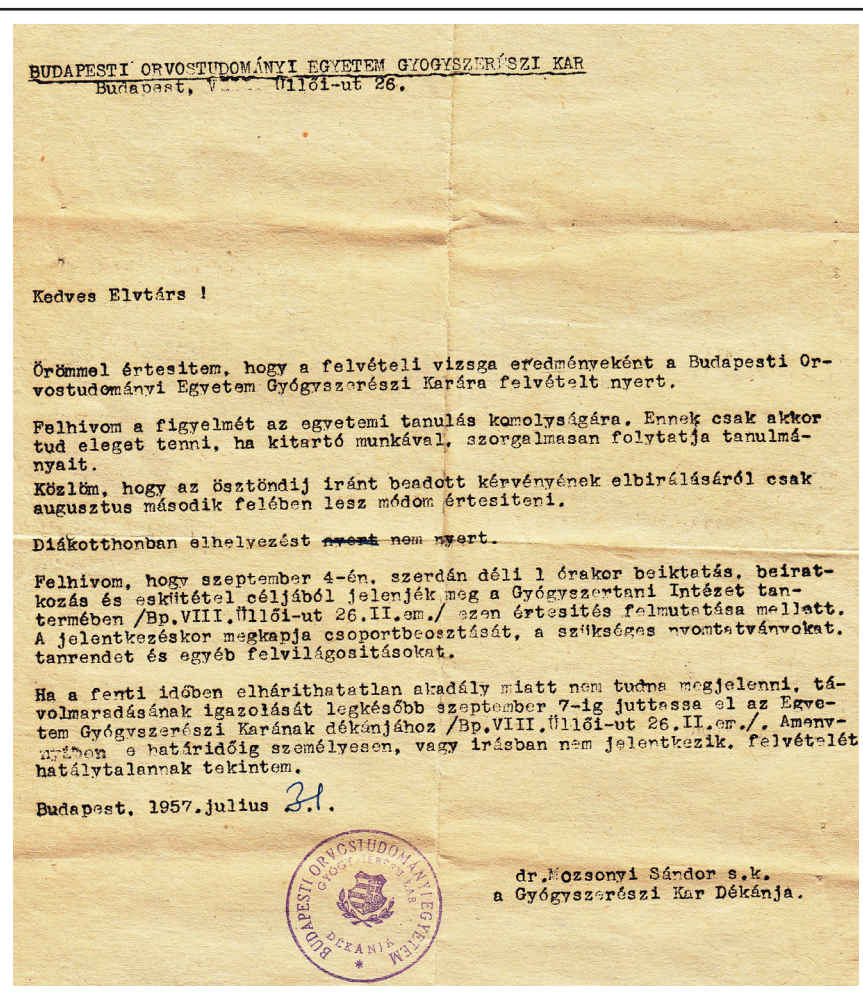
Pótolhatatlan veszteség érte a magyar gyógyszerész társadalmat, az analitikai kémia tudományát, a Budapesti Műszaki és Gazdaságtudományi Egyetemet és a Magyar Tudományos Akadémiát, amikor 2013. december 9-én elhunyt Szepesváryné Dr. Tóth Klára professzor, a Magyar Tudományos Akadémia rendes tagja.

Nagykanizsán született 1939. február 6-án. Gyermekéveit a Zala megyei Galambokon töltötte, majd Szentendrén, a Ferences Gimnáziumba járt, ahol nagyszerű kémia tanára, *Töhötöm atya* megszerette vele a kémiát. Pályaválasztásához ez adta az egyik jelentős motivációt. A másikat az, hogy a szentendrei évek alatt megismerkedett egy kitűnő gyógyszerésszel, akivel beszélgetvén tudatosult benne, hogy a gyógyszerészet az a pálya, melynek egyaránt lényege a kémia, a gyógyítás, az emberszeretet és a mások baja iránti érzékenység (ez utóbbi tulajdonságokat valószínűleg a szülői házból hozta). 1957-ben érettségizett. A Budapesti Orvostudományi Egyetem 2 évvel korábban önállóvá vált Gyógyszerészi Karára (akkoriban így hívták) annak ellenére elsőre felvették, hogy korántsem volt jó káder és a Ferences Gimnázium növendékeinek felvételét bármely felsőoktatási intézménybe az akkori rendszer kifejezetten ellenjavallotta. Kor- és tudománytörténeti emlékként mellékeljük Mozsonyi Sándornak, az ország első gyógyszerész dékánjának Tóth Klárához írt, a felvételtől tájékoztató levelét.

Kiváló hallgató volt, kitüntetéses gyógyszerészi okleve-



let 1962-ben kapott. Egyetemi oktatói közül a vele készült interjúban megkülönböztetett szeretettel emlékezett meg *Kőrös Endréről* és élményszámba menő szervetlen kémia előadásairól, *Végh Antal* professzorról, nem utolsósorban pedig a Schulek Intézetéről, ahol *Szakácsné Pintér Margit* volt a gyakorlatvezetője kvantitatív analitikából és ahol felfigyelt tehetségére későbbi mentora, *Pungor Ernő* professzor, az analitikai kémia egy másik óriása. Pungor Ernő hívására az akkoriban alakuló Veszprémi Vegyipari Egyetem Analitikai Kémiai Tanszékére került, ahol 2 év múlva egyetemi doktori fokozatot szerzett.



Kutatási területe az elektroanalitika volt, benne új típusú ionszelektív érzékelők fejlesztése, biológiai és környezet-analitikai alkalmazása, a kémiai és bioszenzor-kutatás, az ezekben kialakuló molekuláris kölcsönhatások feltárása. Rangos külföldi egyetemeken dolgozott tudományos munkatársként vagy vendégprofesszor-ként (University of Birmingham, 1964-1966, University of North Carolina, Chapel Hill, 1985, University of Texas at Austin 1992, 1994, NIST Gaithersburg, 1995, University of Cambridge, 1997).

1970-ben Veszprémből a Budapesti Műszaki Egyetem Általános és Analitikai Kémiai Tanszékére került, továbbra is Pungor professzor munkatársaként. 1970-ben védte meg kandidátusi, 1991-ben akadémiai doktori értekezését. 1995-ben választották a Magyar Tudományos Akadémia levelező, 2001-ben rendes tagjává. Akadémiai székfoglaló előadásának címe *„A miniaturizálás térhódítása az elektroanalitikában”* (2001. október 16.) talán mentalitását is jelképezi: a látzólag kis értékek megbecsülését, a tudomány iránti alázatot, a szerénységet. 2007-től a Magyar Tudományos Akadémia – Budapesti Műszaki és Gazdaságtudományi Egyetem Műszaki Analitikai Kémiai Kutatócsoportjának a vezetője volt. Oktatómunkájában az elektroanalitika és a gyógyszeranalízis dominált. Az analitikai kémiát a világ számos országában – köztük külön kurzusokban fejlődő országokban Ázsiától Afrikáig – tanította.

Szakmai-tudományos közéleti tisztségei közül néhány: az MTA Analitikai Bizottság elnöke volt. Tagja volt a Gyógyszerésztudományi Országközi Bizottságnak, az Analitikai és Környezeti Kémiai Tudományos Bizottságnak, az Elektroanalitikai Munkabizottságnak, a Kémiai

Doktori Bizottságnak, a Magyar Kémikusok Egyesületének.

Jelentős kitüntetések vehetett át: a finn Abo Akademi díszdoktora lett, így Turkuban a magyar zászlót a tiszteletére húzták fel a város közterén. 1978-ban kapott Akadémiai-díjat, 2000-ben Széchenyi-díjat. 2011-ben, a Kémia Nemzetközi Éve alkalmából a IUPAC, a kémia nemzetközi uniója díjat alapított *„Kiemelkedő Nők a Kémiában és a Vegyészmérnökségben”* néven, melyben a világ valamennyi országából kiválasztott összesen 23 díjazott egyike – Nobel-díjas társaságban – Tóth Klára volt.

Számos vonatkozásban volt első vagy egyetlen. A Magyar Tudományos Akadémia Kémiai Osztályának első – és sokáig egyedüli – női tagja volt. Úgyszintén a Budapesti Műszaki és Gazdaságtudományi Egyetem Vegyészmérnöki Karának első női professzora volt, halálával pedig a Magyar Tudományos Akadémia egyetlen gyógyszerész végzettségű tagját veszítettük el.

Gyógyszerészi aranydiplomáját 2012 novemberében vette volna át. Az ünnepségre, az évfolyamtársakkal, a régi barátokkal való találkozásra nagy szeretettel és várakozással készült. 2012 tavaszán – közismert szerénysége ellenére – az ünnepségre tervezett beszédje elmondása elleni ódzkodását is sikerült feloldani. De a gonosz és ostoba kór már nem engedte meg, hogy a jubileumi díszoklevél-átadási ünnepségen részt vegyen.

A legszakszerűbb, legszeretetteljesebb családi ápolás ellenére 2013. december 9-én elhunyt.

Tudása, szerénysége, szorgalma, teljesítménye, elhivatottsága, nagyszerű szakmai pályája generációk számára ad példát.

Noszál Béla



## Dr. Laszlovszky József (1923 – 2014)

2014. január 11-én elhunyt Dr. Laszlovszky József, gyógyszerész-hallgatók ezreinek analitikai kémia oktatója, a gyógyszeranalízis klasszikus módszereinek kiváló képviselője, nagyszámú magas és felelősségteljes szakmai-tudományos funkció viselője, a gyógyszerési elhivatottság megtestesítője.

1923. február 25-én született Pomázon, gyógyszerészi rokon-sággal is rendelkező családban. Gimnáziumi tanulmányait a budapesti piarista gimnáziumban végezte, kiváló eredményekkel. Tudomány- és gyógyszerészet-történeti érdekesség, hogy itt osztálytársa volt Bayer István, az Országos Gyógyszerészeti Intézet későbbi főigazgatója, akihez 80 éves barátság és másfél évtizedes közeli munkakapcsolat is fűzte.

1941-ben kezdte meg egyetemi tanulmányait a budapesti Pázmány Péter Tudományegyetemen. E tanulmányokat azonban a háború viharai igencsak próbára tették. Tagja volt annak az évfolyamnak, melyet – mint arról Laszlovszky tanár úr 2006-ban, gyémántdiplomája átvételekor tartott, történelmi távlatokat felidéző, lebilincselő beszédében beszámolt – a háború elől tanárostul, műszerestül, vegyszerestül Németországba telepítettek.

Gyógyszerészi diplomáját 1946-ban kapta meg, mely után a Pázmány Péter Tudományegyetem (később ELTE) legendás Szervetlen és Analitikai Kémiai Tanszékére került, Schulek Elemér professzornak, a Magyar Tudományos Akadémia Kémiai Osztálya első elnökének hívása alapján. Itt 1970-ig dolgozott, Schulek professzor úr egyik legközelebbi munkatársaként, olyan kiváló kollégák társaságában, mint pl. Kőrös Endre, Burger Kálmán, Barcza Lajos, Perl Miklós-né, Lászlóty Alexandra. Az oktatásban számos tárgybán gyakorlatvezetőként, valamint a „Kvalitatív kémiai analízis” és a „Gyógyszerellenőrzés” kollégiumok előadójaként vett részt. Ezen oktatómunkának más áldása is lett: gyakorlatvezetőként ismerkedett meg a későbbiekben szintén gyógyszeranalitikára szakosodó kiváló tanítvány Groma Gizellával, akivel 1953-tól 60 éven át



éltek boldog házasságban, két nagyszerű gyermeket (egy gyógyszerészt és egy régészt) is adva a hazának.

Kutatási témája a gyógyvizekben és biológiai anyagokban található halogénidek ill. szervesen kötött halogének meghatározása volt, nem utolsósorban a rendkívüli óvatosságot igénylő brómcianós módszerrel. Gyógyszerész doktorrá 1949-ben avatták „*summa cum laude*” eredménnyel. Kandidátusi értekezésében a hidroxiantrakinon hidrogén-peroxid/kobalt katalizátoros oxidációjának

eredményeit foglalta össze (1962). Schulek Elemér professzor úrnak 19 éven át volt munkatársa, együtt kezdték írni a „Gyógyszerellenőrzés” c. könyvet, melyet – Schulek professzor úr 1966-ban bekövetkezett váratlan halála után – Laszlovszky tanár úr egyedül fejezett be.

1970-ben lett az Országos Gyógyszerészeti Intézet munkatársa, a Gyógyszerkönyvi Osztály vezetőjeként, a tudományos főigazgató-helyettesi teendőket is ellátva. Három magyar gyógyszerkönyv szerkesztésében is igen aktív szerepet vállalt: Ph.Hg. V. (1954), Ph.Hg. VI. (1967), Ph.Hg. VII. (1986). Fontos feladatának tekintette a gyógyszerkönyv és a gyógyszerértékesítéskönyv összehangjának megteremtését.

A szakmai-tudományos közéletben számos funkciót töltött be: Titkára volt az Egészségügyi Minisztérium és az Akadémia közös szakbizottságának, a WHO szakértőjeként részt vett a III. Nemzetközi Gyógyszerkönyv előkészítésében, tagja volt a Nemzetközi Gyógyszerkönyvi Bizottságnak. A magyar delegáció vezetőjeként vett részt a Compendium Medicamentorum tárgyalásain. Aktív részese volt a Magyar Gyógyszerésztudományi Társaság felszámolását követő újrakezdésnek, melynek eredményeként 1966-ban megalakulhatott a Magyar Gyógyszerészeti Társaság, ahol 1973 és 1975 között a Gyógyszeranalitikai Szakosztályt vezette. A Magyar Kémikusok Egyesülete és a Magyar Gyógyszerészeti Társaság vezetőségi tagja, a Gyógyszerészet és az Acta Pharmaceutica Hungarica folyóiratok szerkesztőbizottságának tagja volt.

Bár önmagát sohasem állította előtérbe, nem kerültek el az elismerések: Kiváló Gyógyszerész, a Munka Érdemrend kitüntetője. Megkapta a Schulek Emlékérmét, a Than Károly Emlékérmét és a Societas Pharmaceutica Hungarica jutalomérmét. Az MGYT szenátusának tagja volt. A Magyar Gyógyszerészi Kamara elnöksége 2005-ben munkássága elismeréseként a Kamara Aranyérmével tüntette ki, születésének 90. évfordulója alkalmából pedig a Magyar Gyógyszerésztudományi Társaság Szebellédy László Emlékéremmel fejezte ki elismerését.

Laszlovszky tanár úr élete és munkássága maga a gyógyszerészi erények megtestesülése: a pontosság, lojalitás, megfontoltság, hivatástudat bármely poszton és élethelyzetben, kiváló felkészültséggel párosulva.

A családtagok és tisztelők sokasága 2014. január 18-án a pomázi régi katolikus temetőben, majd a budapesti Szent Imre Kápolnában bemutatott szentmisén vett tőle búcsút.

Emlékét kegyelettel őrizzük!

*Noszál Béla*

## A trehalóz, mint amorfizálódásra hajlamos segédanyag, rekrisztallizációjának vizsgálata

KATONA GÁBOR, JÓJÁRTNÉ LACZKOVICH ORSOLYA ÉS SZABÓNÉ RÉVÉSZ PIROSKA\*

Szegedi Tudományegyetem, Gyógyszertechnológiai Intézet, Szeged, Eötvös u. 6. – 6720

\*Kapcsolattartó email címe: revesz@pharm.u-szeged.hu

### Summary

Katona, G., Jójárt-Laczovich, O., Szabó-Révész, P.\*: *Investigation of the recrystallization of trehalose as a good glass-former excipient*

An amorphous form of trehalose is easy to prepare by using a solvent method. The recrystallization kinetics can be followed well, which is important because of the occurrence of polymorphic forms of trehalose. This is especially significant in the case of dry powder inhalers. Spray-drying was used as a preparation method this being one of the most efficient technologies with which to obtain an amorphous form. This method can result in the required particle size and a monodisperse distribution with excellent flowability and with moreover considerable amorphization. In our work, trehalose was applied as a technological auxiliary agent, and literature data relating to the spray-drying technology of trehalose were collected. Studies were made of the influence of the spraying process on the amorphization of trehalose and on the recrystallization of amorphous trehalose during storage. Amorphous samples were investigated under 3 different conditions during 3 months. The recrystallization process was followed by differential scanning calorimetry and X-ray powder diffraction. The results demonstrated the perfect amorphization of trehalose during the spray-drying process. The glass transition temperature was well measurable in the samples and proved to be the same as the literature data. Recrystallization under normal conditions was very slow but at high relative humidity the process was accelerated greatly. Amorphous trehalose gave rise to dihydrate forms ( $\gamma$ - and  $h$ -trehaloses) during recrystallization, and  $\beta$ -trehalose was also identified as an anhydrous form.

**Keywords:** trehalose, amorphous form, spray-drying, recrystallization, polymorphism.

### Összefoglalás

A trehalóz oldószeres eljárással könnyen amorfizálható anyag. A rekrisztallizáció folyamata jól nyomon követhető, vizsgálata pedig indokolt a spontán amorfizálódás következtében megjelenő különböző polimorf módosulatok miatt. Ennek különösen a porinhalációs készítményeknél van jelentősége. Oldószeres eljárásként a porlasztva szárítást alkalmaztuk, amivel kívánt szemcseméretű, kiváló folyási tulajdonsággal rendelkező monodiszperz rendszer állítható elő, valamint nagymértékű amorfizálódás következhet be. A kísérletes munka előzményeként bemutatjuk a trehalózt, mint a gyógyászatban alkalmazott segédanyagot és annak legfontosabb tulajdonságait, illetve porlasztva szárítással történő feldolgozásának irodalmi hátterét. Arra kerestük a választ, hogy porlasztva szárítással előállítható-e amorf trehalóz, s különböző körülmények között tárolva (3 hónap), milyen változásokat tapasztalunk. Analitikai módszerként a differenciális pásztázó kalorimetriát és a porröntgen diffrakciós módszert alkalmaztuk. Megállapítottuk, hogy a porlasztva szárítás nagymértékű amorfizálódást okoz a mintákban. Az üvegesedési hőmérséklet mérhető és az irodalmi értékkel megegyező tartományba esik. Továbbá megállapításra került, hogy magas páratartalmú közegben a trehalóz túlnyomórészt dihidrát formában ( $\gamma$ - és  $h$ -trehalóz) kristályosodik vissza, és a rekrisztallizáció üteme lényegesen felgyorsul. A rekrisztallizáció során egyéb polimorf módosulatot is azonosítottunk (anhidrát  $\beta$ -trehalóz).

**Kulcsszavak:** trehalóz, amorf forma, porlasztva szárítás, rekrisztallizáció, polimorfia

### Bevezetés

A gyógyszerformák tervezésénél a hatóanyagok mellett a segédanyagok is kulcsfontosságú szerepet töltenek be. A helyes segédanyag megválasztásával jobb oldódási profil, nagyobb stabilitás, módosított hatóanyag leadás és jobb préselhetőség érhető el [1]. Az iparban általában kristályos formában dolgozzák fel a ható- és segédanyagokat a formulálás során, azonban egyes esetekben kedve-

zőbb tulajdonságok érhetőek el az amorf forma alkalmazásával. Ezen tulajdonságok közé tartozik a jobb vízzoldékonyság, jobb préselhetőség, ismételt szabadalmaztathatóság és a polimorf módosulatok egymásba alakulásának megakadályozása [2].

A száraz porinhalációs készítményeket (Dry Powder Inhaler – DPI) leggyakrabban porlasztva vagy fagyasztva szárítással állítják elő. Ezekkel az eljárásokkal kívánt szemcseméretű, valamint kívá-

ló folyási tulajdonsággal rendelkező monodiszperz rendszer állítható elő, viszont nagymértékű amorfizálódást is eredményezhet. A folyamatot, amikor az anyag valamely gyártásközi művelet, esetleg a tárolás során részben vagy egészben amorfizálódik, „indirekt amorfizálásnak”, vagy amorfizálódásnak nevezzük. A kristályos és az amorf forma aránya a porinhalációs készítmények alkalmazhatóságát jelentősen befolyásolja, így folyamatos kontrollálást igényel mind a gyártás, mind pedig a felhasználásig történő tárolás során.

### A kísérletes munka modell segédanyaga

A kísérletes munka modell anyagának a trehalózt választottuk, mint amorfizálódásra hajlamos segédanyagot, mivel a feldolgozás során könnyen amorfizálódhat. A trehalóz  $\alpha$ -D-glükopiranozil- $\alpha$ -D-glükopiranozid-dihidrát ( $\alpha,\alpha$ -trehalóz-dihidrát) vagy mikóz, ami egy természetes alfa-kötésű diszacharid, amelyet két  $\alpha$ -glükózegység alkot  $\alpha$  1 $\rightarrow$ 1 glikozidos kötéssel (1. ábra). Fehér, vagy csaknem fehér kristályos por, amely vízben bőségesen, metanolban alig és etanolban gyakorlatilag nem oldódik.

A trehalóz a természetben is előforduló anyag. Gombák (ebből adódik egyik szinoním neve, a mikóz = „gomba cukor”), növények és gerinctelen állatok is bioszintetizálják. Széles körben alkalmazzák segédanyagként az ipar több területén is, mint például a kozmetikai-, mezőgazdasági-, élelmiszer- és a gyógyszeriparban. Az iparban a keményítő enzimatiszálásával állítják elő. Más diszacharidoktól eltérően, az előállítás folyamán nem lép kémiai reakcióba aminosavakkal vagy fehérjékkel, és ez megakadályozza a termék barnulását (Maillard reakció). A trehalóz egy nem reaktív cukor. Erős stabilitása a két glükopiranoz gyűrűt összekötő glikozidos kötés kis energiájának (1 kcal/mol) köszönhető. Nem disszociál két

redukáló monoszacharid alkotórészre, csak extrém hidrolitikus körülmények között vagy trehaláz enzim hatására (amelyet a gombák és az emberi szervezet is szintetizál).

Szerepet játszik a növények és állatok anhidrobiózisában, vagyis abban a tulajdonságukban, hogy hosszú ideig képesek életben maradni víz nél-

kül. Nagy víztartó képességét a kozmetikai- és élelmiszeriparban is hasznosítják.

A biomolekula stabilizációjának mechanizmusát először Fourier-transzformációs infravörös spektroszkópia (FT-IR) alkalmazásával vizsgálták a fehérjék és cukrok közötti kölcsönhatások jellemzésének céljából. Ezt követően infravörös (IR) és Raman-spektroszkópia segítségével kimutatták, hogy a trehalóz legjelentősebb funkciója, hogy koncentrálna azt a kis mennyiségű vizet a fehérje közelében, amely a funkció megtartásához szükséges. A trehalóz fehérjestabilizáló képességét az ipar számos területén hasznosíthatják; például a kozmetikai iparban hidratáló készítményekben, vagy a gyógyszeriparban liposzóma stabilizálására.

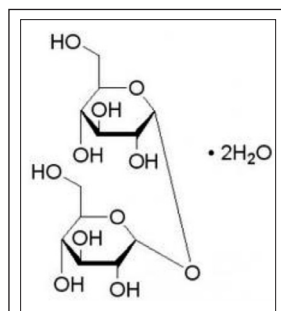
Az élelmiszeriparban szintén alkalmazott segédanyag. Itt édesítő- és stabilizáló szerként egyaránt használják. Édessége a szacharóz 45%-ával egyezik meg.

A gyógyszerészatban hatóanyagként is felhasználásra kerül. „Chaperone” elnevezésű anyagként használják, amely segítséget nyújt a Creutzfeld-Jacob kórt, cisztás fibrózist és amiloid rendellenességeket okozó fehérje aggregációjának megelőzésében.

A trehalóz segédanyagként való legfontosabb alkalmazási területei gyógyszerészeti szempontból az oltóanyagok stabilizálása szobahőmérsékleten való tárolás céljára, enzimek tartósítása, illetve emlős sejtek liofilizálás alatti károsodástól való védelme. Mivel koncentrálna a fehérje közelében a vizet, így az a liofilizálás után vissza tud rendeződni natív szerkezetébe és visszanyeri funkcióját. Fejlődő országokban a járványos gyermekbénulás ellen alkalmazott orális oltóanyagok előállításánál azt tapasztalták, hogy trehalóz jelenlétében 45 °C-on szárítva azok stabilak maradtak, összehasonlítva a 4 °C-on lefagyasztott folyékony oldattal [3]. A trehalóz másik fontos alkalmazási területe a DPI formában történő hordozóanyagként való felhasználása [4-6].

A trehalóz is, mint nagyon sok más a gyógyszeriparban alkalmazott ható- és segédanyag, polimorfiára hajlamos. A segédanyagok polimorfiájának nagy jelentősége van a gyógyszeriparban, hiszen ez alapvetően meghatározza az adott forma olvadáspontját, oldékonyságát, fizikai és kémiai stabilitását. A trehalóznak 4 polimorf módosulata ismeretes, amelyek különböző olvadásponttal rendelkeznek (I. táblázat) [7].

A fent említett példák azt támasztják alá, hogy a trehalóz, mint gyógyszeripari segédanyag, számtalanszor kerül feldolgozásra porlasztva [4, 8-10] és fagyasztvaszáritással [11-13]. Mivel ezek



1. ábra: Trehalóz (D(+)-trehalóz-dihidrát) szerkezeti képlete



I. táblázat

*A trehalóz polimorf módosulatainak olvadáspontja [7]*

Polimorf módosulat neve	Olvadáspont (°C)
$\alpha$ -trehalóz	126
$\beta$ -trehalóz	215
$\gamma$ -trehalóz	118-122
h-trehalóz	100-110

az eljárások gyakran okoznak amorfizálódást, ezért a segédanyag ilyen szempontból történő vizsgálata igen érdekes lehet. Forgalomban lévő liofilezéssel formulált védjegyzett készítmény például az ADVATE<sup>®</sup>, amelyben a hatóanyagot, a rekombináns VIII-as véralvadási faktort, a trehalóz stabilizálja [14]. Továbbá a 4 polimorf módosulat létezése a rekrisztallizáció követését is indokolja.

### Az amorfizálás technológiai megvalósítása

Az amorf anyagok kialakulására / kialakítására három technológia alkalmazható: *olvadék technológia, őrléses és oldószeres eljárások* [15]. Olvadék technológiával két úton lehet amorf anyagot előállítani. Az egyik művelet során a kristályos anyagot megolvasztjuk, majd ezt az olvadékot hirtelen dermesztjük. A másik művelet során a kristályos anyagot a segédanyag olvadékában diszpergáljuk, majd ezt az olvadékot szintén dermesztjük [16]. Dezintegráló műveletek közül őrléssel is előállíthatunk amorf anyagot. Őrlés során olyan mértékű mechanikai erőt fejtünk ki a kristályrácsra, amekkorát az az elasztikus határok közt nem képes tolerálni, így megváltozik a szerkezete. A keletkező hő hatására a lokális olvadások miatt is amorfizálódhat az anyag [17]. Az oldószeres eljárások között három csoportot különíthetünk el: hőmérsékletemeléssel történő dehidráció, nyomáscsökkenéssel történő szárítás (liofilezés) [18], porlasztásos technológia [19]. Jelen munka az oldószeres megoldások témakörét, azon belül is a porlasztva szárítást érinti.

### Porinhalációs készítmények formuláláshoz alkalmazott segédanyagok gyógyszertechnológiai vonatkozásai

A porlasztva szárítás egyik jelentős felhasználási területe a por inhalációs készítmények előállítása. A porinhalációs rendszerek pulmonális gyógyszerbevitelre alkalmas szilárd fázisú készítmények. Fő előnyük, hogy nagy koncentrációjú hatóanyagot juttathatunk célzottan a tüdőbe és minimális az extrapulmonális veszteség. Kiválthatunk

vele helyi illetve szisztémás hatást, valamint kedvező a biológiai hasznosíthatósága. Ennek a gyógyszerformának a fejlesztése, relatíve kevés segédanyaggal megoldható, a hatóanyag stabilitásának biztosítása egyszerű. Nincs hajtógáz, csupán egy adagolócsavar, melynek kattanásig történő tekerésével a „unit dose” adagolás biztosított, így nem kell tartani a túladagolástól sem [20]. A szemcseméretnek 1-5  $\mu\text{m}$ -es mérettartományba kell esnie, mivel az ennél nagyobb szemcsék nem jutnak át a légutakon az alkalmazás helyére, az ennél kisebbek pedig a kilégzéssel távoznak. Ahhoz viszont, hogy a por jó folyási tulajdonságokkal rendelkezzen, ne legyen kohezív és jól lehessen dózírozni, segédanyagokra van szükség. Ezeket az anyagokat, amelyek a hatóanyagot célba juttatják, hordozóanyagnak hívjuk. Erre általában  $\alpha$ -laktózmohidrátot alkalmaznak, de az új készítményekben már más segédanyagokkal is helyettesíthetik a laktózt. Ennek egyik oka a TSE (átadható spongiform enkefalopátiás betegségek) elkerülése, a másik pedig, hogy a laktóz reakcióba léphet az amino csoporttal, így fehérje és peptid készítmény nem formulálható vele. Ebben az esetben a laktózt többek között trehalózzal helyettesítik. Lehetőség van még a raffinóz és a szukróz alkalmazására is. Ezeknek a nem redukáló cukroknak van egy olyan közös kedvező tulajdonsága, hogy porlasztva szárítás során megvédi a fehérjéket vagy peptidket a különböző stresszhatásokkal szemben. Helyettesítik a hidrogénkötéseket, amelyeket normál esetben a víz tesz, valamint viszkozus keveréket alkotnak a fehérjével, melynek következményeként magas üvegesedési hőmérsékletű termék keletkezik [21].

### Kísérletes munka

A kísérletes munkánk arra világít rá, hogy a polimorfira hajlamos amorfizált vagy amorfizálódott segédanyagok a hőmérséklet és a relatív páratartalom viszonyának változására különböző polimorf módosulatok formájában kristályosodhatnak vissza és ennek nagy jelentősége van a feldolgozás, valamint az alkalmazás során. Mivel a Szegedi Tudományegyetem Gyógyszertechnológiai Intézetében már van tudományos előzménye az anyagok amorfizálhatóságának [15, 22-26], így azt a célt tűztük ki magunk elé, hogy a porinhalációs készítmények egyik fontos komponensének a trehalóznak, az amorfizálódását és az amorf forma tárolás során bekövetkezett rekrisztallizációját, polimorf módosulatait tanulmányozzuk.

### Kiindulási segédanyag

A kiindulási anyag a D(+)-trehalóz-dihidrát volt (Carl. Roth. GmbH + Co. KG. 76185 Karlsruhe). Ezt tekintettük 100%-os kristályos anyagnak. Víz tartalma  $9,5 \pm 0,5\%$ , szulfáttartalma pedig kevesebb, mint  $0,5\%$  volt. Fajlagos forgatóképessége:  $178 \pm 2^\circ$ .

#### Minták előállítása

A kísérletes munkánk során két mintát állítottunk elő, azonos körülmények között. Mindkét esetben a trehalózból tisztított vízzel 10%-os oldatot készítettünk mágneses keverő segítségével, és ezt az oldatot BÜCHI B-191 Mini Spray Dryer (Büchi, Svájc) készülékkel porlasztottuk a **II. táblázatban** megadott paraméterek mellett [10]. Az így nyert terméket szobahőmérsékleten ( $25 \pm 2^\circ\text{C}$ ) exsikkátorban tároltuk  $32 \pm 5\%$ -os relatív páratartalmú (RH) légtérben a vizsgálatok indításáig.

#### Tárolási körülmények

A mintákat 3 hónapig tároltuk, különböző körülmények (hőmérséklet, relatív páratartalom-RH) befolyását vizsgálva [27]. Az első porlasztott mintát (**I**) normál körülmények közt tároltuk, míg a másodikat (**II**) két részre osztottuk, egyik felét a gyorsított stabilitási vizsgálatoknak (**IIa**), másik felét pedig ennél intenzívebb terhelésnek (**IIb**) vetettük alá, a következők szerint:

- normál körülmények között (**I**), exsikkátorban,  $25 \pm 2^\circ\text{C}$  és  $32 \pm 5\%$  RH,
- a gyorsított stabilitási vizsgálat körülményei között (**IIa**),  $40 \pm 2^\circ\text{C}$ ,  $75 \pm 5\%$  RH [26],
- intenzíven terhelt kondíciók között (**IIb**),  $60 \pm 2^\circ\text{C}$ ,  $90 \pm 5\%$ .

Utóbbi kettőnél mi állítottunk elő különböző koncentrációjú kénsav tartalmú higrosztát tölteteket és termosztátba helyeztük azokat. A tárolási körülményeket folyamatosan kontrolláltuk.

II. táblázat

#### Porlasztási paraméterek

Paraméterek	Beállítás
Bemenő hőmérséklet ( $^\circ\text{C}$ )	130-140
Kimenő hőmérséklet ( $^\circ\text{C}$ )	75-92
Pumpaáramlás (ml/min)	2
Sűrített levegő nyomása (bar)	4,8
Atomiser pumpaáramlás (normoliter/h)	600
Aspirátor (%)	80
Pumpa áramlása (%)	2

### Vizsgáló módszerek

A mintákat METTLER Toledo 821<sup>e</sup> DSC (Mettler-Toledo GmbH., Gießen, Németország) segítségével vizsgáltuk. Ennek a módszernek a segítségével igazoltuk a trehalóz amorf formájának létét és az amorf forma üvegesedési hőmérsékletét ( $T_g$ ) is követni tudtuk a rekrisztallizációs folyamat során. A mérés során  $5 \pm 0,2$  mg mintát mértünk alumínium tégelybe analitikai mérleg segítségével, majd a tégelyt lezártuk és behelyeztük a kemencébe. A kemencét  $25^\circ\text{C}$ -tól  $250^\circ\text{C}$ -ig fűtöttük fel  $10^\circ\text{C}/\text{min}$  fűtési sebességgel és mértük a mintában lejátszódó termikus változásokat. Az eredményeket STAR<sup>e</sup> szoftver segítségével értékeltük ki.

A visszakristályosodás folyamatának meghatározásához porröntgen diffrakciós vizsgálatokat is végeztünk. Erre Bruker D8 Advance diffraktométerrel (Bruker AXS GmbH., Karlsruhe, Németország) berendezést használtunk. Sugárforrásként Cu K $\alpha$ 1 sugárzást ( $\lambda = 1.5406 \text{ \AA}$ ) alkalmaztunk. A minták vizsgálata  $40 \text{ kV}$  feszültség és  $40 \text{ mA}$  áramerősség alkalmazása mellett  $3^\circ$ -tól  $40^\circ$ -ig ( $2\theta$ ) történt. A szkennelési sebesség  $0,1^\circ/\text{min}$ , a lépésköz pedig  $0,010^\circ$  volt. A műszer kalibrálása korund segítségével történt. Az eredmények kiértékelésére pedig DIFFRACTplus EVA szoftvert alkalmaztunk. A diffraktogramokat K $\alpha$ 2-vel korrigáltuk, simítottuk és az alapvonal korrekcióját is elvégeztük. A termékek azonosítására a Cambridge-i Krisztallográfiai Adatbázist használtuk.

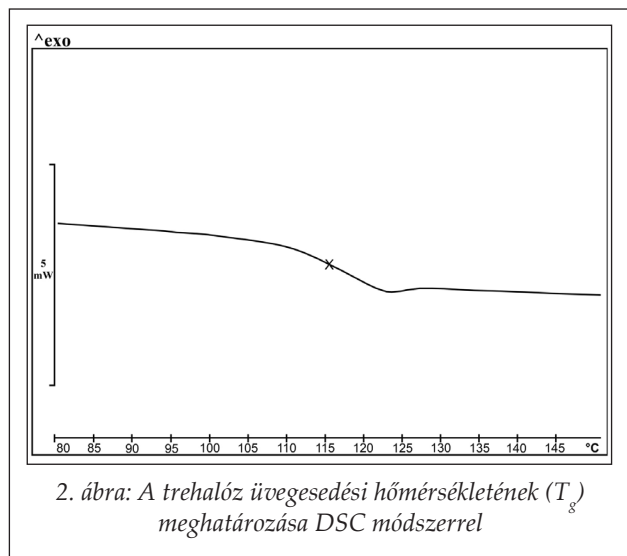
#### Differenciális pásztázó kalorimetriás vizsgálatok (DSC)

A trehalóz  $T_g$ -je kísérletes úton, DSC vizsgálattal meghatározható. A mintát felfűtöttük olvadáspontja fölé, majd visszahűtöttük szobahőmérsékletre és megismételtük a fűtést ugyanazzal a fűtési sebességgel. A következőket tapasztaltuk:

- a második melegítés során eltűnt a karakterisztikus olvadáspont,
- a fűtési folyamat során nem érzékelünk bomlásra utaló jelet,
- a  $T_g$  láthatóvá vált a görbén (**2. ábra**).

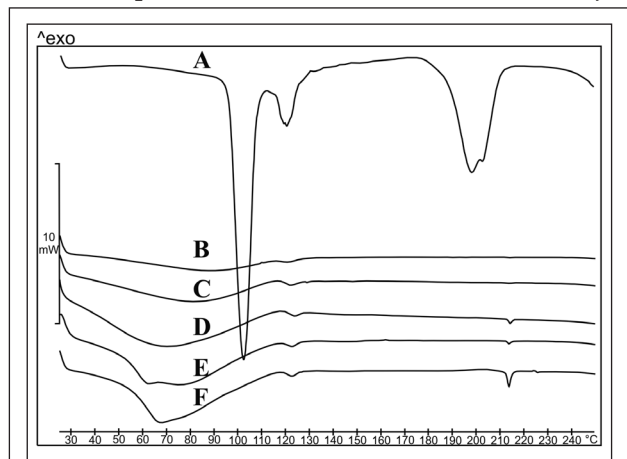
Az átmenet  $109,3$ - $130,0^\circ\text{C}$ -ig tart, középértéke  $115,4^\circ\text{C}$ -nál található. A trehalóz irodalomból ismert  $T_g$ -je szintén ebben a tartományban található [7].

Irodalomból ismeretes, hogy az üvegesedési hőmérséklet és az olvadáspont hányadosa előrejeletheti az anyag amorfizálhatóságát [25]. A **3. ábrán** látható, hogy a kiindulási trehalóz három poli-



morf keveréke (A görbe). A görbe alatti terület arányos az egyes módosulatok mennyiségével. Legnagyobb arányban a h-trehalóz található meg és ez a legjobban amorfizálható módosulat,  $T_g/T_m$  (K/K) értéke 1,03. Szintén jól amorfizálható a legkisebb mennyiségben előforduló  $\gamma$ -trehalóz,  $T_g/T_m$  (K/K) értéke 0,98. A legkisebb  $T_g/T_m$  (K/K) értékkel a  $\beta$ -trehalóz rendelkezik (0,71), de még ez a polimorf is a jól amorfizálható kategóriába esik. Ezen elővizsgálatok alapján tehát megállapítható, hogy a trehalóz amorf formája állítható elő porlasztva szárítással és igazolást nyert az is, hogy a trehalóz valóban jól amorfizálható segédanyag.

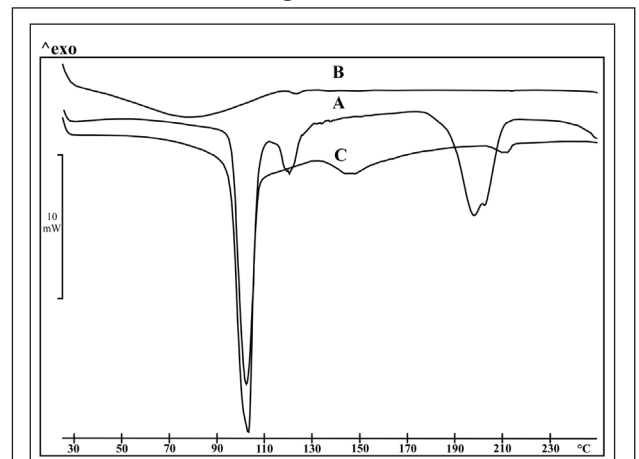
Az első porlasztásból (I) származó minta vizsgálati eredményeit szintén a 3. ábra szemlélteti. Az A görbén a kiindulási kristályos trehalóz látható, három polimorf módosulat különíthető el rajta.



A három csúcs tehát a különböző polimorf módosulatok olvadáspontja. A többi, B, C, D, E és F görbék pedig a porlasztott minta DSC görbéi időrendi sorrendben. A mintákat normál körülmények között tároltuk ( $25 \pm 2^\circ \text{C}$ ,  $32 \pm 5\% \text{RH}$ ), és másfél hónapra keresztül vizsgáltuk. A B görbén a frissen porlasztott minta látható. Megállapítható, hogy a porlasztás nem eredményezett 100%-ban amorf terméket, a minta némi kristályos frakciót tartalmazott, mégpedig a  $\gamma$ -trehalóz (dihidrát) polimorf módosulatot, amelynek  $122^\circ \text{C}$ -nál van az olvadáspontja. Két nappal később vizsgálva láttuk a C görbén, hogy a kristályos frakció nőtt, azaz megindult egy lassú rekristallizációs folyamat. Tizennégy nappal a porlasztás után azt tapasztaltuk a D görbén, hogy megjelent egy másik polimorf módosulat, a  $\beta$ -trehalóz (anhidrát), melynek  $215^\circ \text{C}$ -nál van az olvadáspontja. Harminc (E), majd negyvenkét (F) nappal a porlasztás után azt a következtetést vontuk le, hogy mindkét polimorf módosulathoz tartozó csúcs alatti terület nőtt, azaz nőtt a kristályos frakció mennyisége.

Újabb sarzsot porlasztottunk (II) azonos körülmények között a trehalóz vizes oldatából. Az ezen porlasztásból származó minták vizsgálati eredményeit mutatja a 4. és az 5. ábra.

A 4. ábrán az A görbe a kiindulási kristályos trehalóz DSC görbéje. A B és C görbe pedig a friss és tárolt porlasztott mintáé. Látható, hogy nem eredményezett 100%-ban amorf terméket a második porlasztás sem, a  $\gamma$ -trehalóz (dihidrát) polimorf módosulat megtalálható benne, olvadáspontja  $123^\circ \text{C}$ -nál található. A minták egyik felét  $40 \pm 2^\circ \text{C}$ ,  $75 \pm 5\% \text{RH}$  higrosztát töltetben tároltuk és

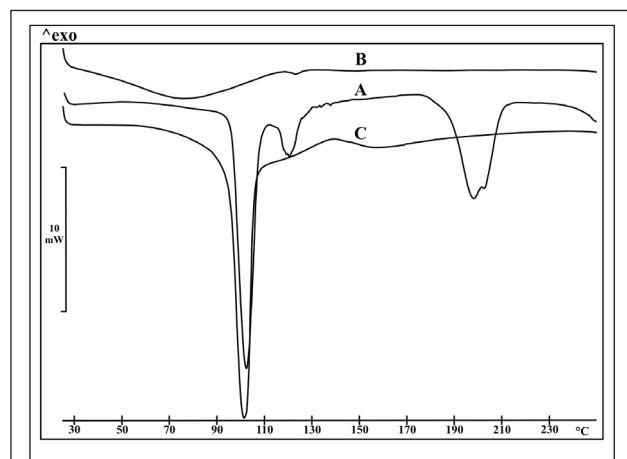


hét nap után vizsgáltuk. A C görbén látható, hogy egy új polimorf módosulat jelent meg a  $\beta$ -trehalóz (anhidrát), 212 °C-nál. Következtetésként levontuk, hogy a gyorsított stabilitási vizsgálat körülményeinek hatására a minták 100%-ban visszakristályosodtak, mégpedig a h-trehalóz (dihidrát) polimorf módosulatába, melynek olvadáspontja 102 °C-nál található.

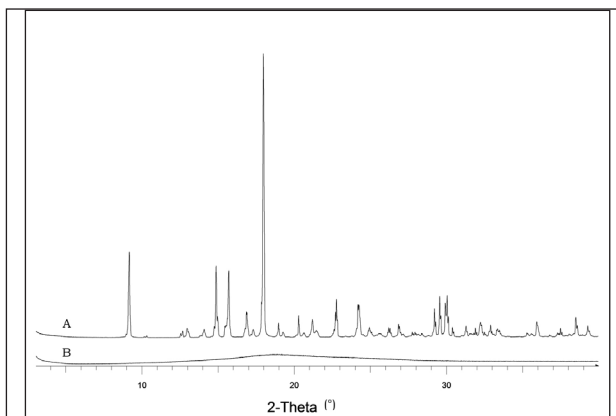
A 5. ábra mutatja a porlasztott minta rekrisztallizációs viselkedését szélsőséges körülmények között. Az A, B, C görbék szintén a kiindulási kristályos trehalóz és a friss és a tárolt porlasztott minták DSC görbéi. A tárolási körülmények ennél a vizsgálatnál a következőképpen alakultak:  $60 \pm 2$  °C-on,  $90 \pm 5\%$  RH, tárolási idő: 7 nap. Ugyanazt tapasztaltuk, a kiindulási kevés kristályos frakciót tartalmazó amorf mintánk hét nap elteltével az agresszív tárolási körülmények hatására 100%-ban visszakristályosodott a h-trehalóz (dihidrát) polimorf módosulatába.

A DSC vizsgálatok eredményeit a III. táblázat foglalja össze. Megjelöltük, hogy a vizsgálatok során az irodalomban fellelhető trehalóz polimorf módosulatok közül, melyeket találtuk meg a mintákban. A DSC vizsgálatokból nyerhető adatok alapján, a minták adott polimorfra vetített kristályosságát is kiszámoltuk és jelöltük a táblázatban. Ez az eredmény félkvantitatívnek tekinthető, de a rekrisztallizációs tendencia leírására alkalmas. A vizsgálatok végén tapasztalt 100% fölötti értékek csupán a módszer félkvantitatív jellegére utalnak.

#### Porröntgen diffrakciós vizsgálatok (XRPD)



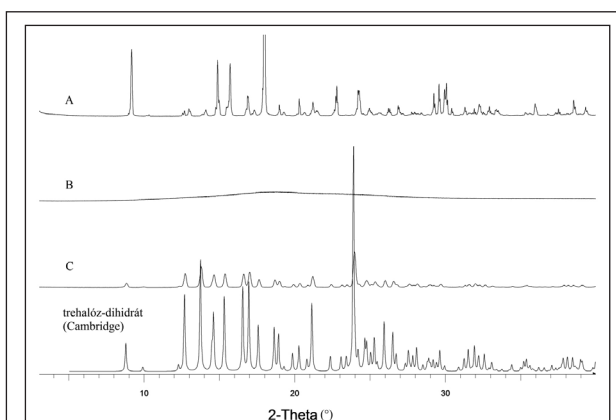
5. ábra: Kiindulási, frissen porlasztott és tárolt minták DSC görbéi: szélsőségesen (IIb) terhelt ( $60 \pm 2$  °C,  $90 \pm 5\%$  RH) körülmények hatása az amorf trehalózra. A: kiindulási kristályos trehalóz, B: frissen porlasztott minta, C: tárolt minta 7 nap után.



6. ábra: Kiindulási anyag és porlasztva szárított termék porröntgen diffraktogramjai: A: kiindulási kristályos trehalóz, B: frissen porlasztott minta.

A porröntgen diffrakciós vizsgálatok eredményei összhangban vannak a DSC mérésekkel, amelyek a 6. ábrán lévő diffraktogramokon jól követhetők. Az ábra jól mutatja, hogy az A jelzésű kiindulási trehalóz kristályos termék, a B pedig az porlasztva szárítás során képződött I. minta, amely röntgen amorfnak tekinthető.

Az újabb (II. minta) XRPD eredményeit a 7. ábra szemlélteti. Az A diffraktogram a kiindulási kristályos trehalóz, a B a frissen porlasztott amorf minta és a C pedig a tárolt minta diffraktogramja. A B görbe kisimult, a jellemző intenzitás értékek eltűntek, azaz röntgen amorf terméket eredményezett a porlasztás. A visszakristályosodó mintában (C) kezdenek megjelenni a karakterisztikus csúcsok, összehasonlítva a Cambridge-i Krisztallográfiai Adatbázisban lévő trehalóz dihidrát polimorf módosulat diffraktogramjával, látható, hogy



7. ábra: A kiindulási és porlasztással előállított minták porröntgen diffraktogramjai: amorf trehalóz rekrisztallizációja és a visszanyert anyag azonosítása. A: kiindulási kristályos trehalóz, B: frissen porlasztott minta, C: normál körülmények között ( $25 \pm 2$  °C és  $32 \pm 5\%$  RH) tárolt 1 napos minta.



III. táblázat

Tárolási körülmények hatására megjelenő polimorf módosulatok (3-5. ábra adatai alapján)

Porlasztott minta	Körülmények			Polimorf módosulat			
	Tárolási idő (nap)	Hőmérséklet (°C)	Páratartalom (RH%)	$\alpha$	$\beta$ (%)	$\gamma$ (%)	h (%)
kiindulási trehalóz				-	42,93	6,84	50,23
I	0	25±2	32±5	-	-	4,47	-
I	2			-	-	6,44	-
I	14			-	0,39	5,74	-
I	30			-	0,21	5,92	-
I	42			-	1,62	6,11	-
IIa	0	40±2	75±5	-	-	5,12	-
IIa	7			-	3,29	-	101,9
IIb	0	60±2	90±5	-	-	5,12	-
IIb	7			-	-	-	104,28

a jellemző csúcsok egybeesnek. A porlasztott termék tehát a trehalóz-dihidrát polimorf módosulatba kristályosodik vissza. A kiindulási kristályos trehalózzal (A) pedig megállapítható, hogy több polimorf módosulat keveréke, a módosulatok reflexiói megjelennek a diffraktogramon.

### Összefoglalás

A kísérletes munka során porlasztva szárítással állítottunk elő trehalóz oldatból amorf szilárd fázisú terméket, majd vizsgáltuk a rekrisztallizáció folyamatát különböző körülményeket alkalmazva a tárolás során. Megállapítottuk, hogy a trehalóz porlasztva szárítással amorfizálódik (kevés kristályos frakció marad a rendszerben). A  $T_g$  mérhető a mintákban és megegyezik az irodalmi értékkel. Láthattuk, hogy viszonylag alacsony páratartalom mellett megindul a rekrisztallizáció, de a teljes folyamat igen lassú, időtartama hónapokban mérhető. Intenzívebb körülmények hatására viszont robbanásszerűen megindult a visszakristályosodás. A trehalóznál a dihidrát forma ( $\gamma$ - és h-trehalóz) a meghatározó a rekrisztallizáció során, de anhidrát forma ( $\beta$ -trehalóz) is detektálható. Megfelelően hosszú idő után a kiindulással megegyező polimorf módosulatok keveréke nyerhető vissza. Ez

azt támasztja alá, hogy azoknál a porinhalációs készítményeknél, ahol trehalóz a hordozó, különös figyelmet kell fordítani a megfelelő tárolási körülmények megválasztására.

„A kutatás a TÁMOP-4.2.2.A-11/1/KONV-2012-0035 Környezeti tényezők és genetikai faktorok interakciójának vizsgálata immunmediált és daganatos betegségek kialakulásába című kiemelt projekt keretében zajlott.”

### IRODALOM

- Pifferi, G., Santoro, P., Pedrani, M.: *Il Farmaco* 54, 1–14 (1999).
- Yu, L.: *Adv. Drug Deliver. Rev.* 48, 27–42 (2001).
- [http://www.omikk.bme.hu/collections/mgi\\_fulltext/bio/2003/06/0602.pdf](http://www.omikk.bme.hu/collections/mgi_fulltext/bio/2003/06/0602.pdf) [2013.06.13.] Molnár, K.: Élelmiszeripari biotechnológiák: A trehalóztermelés új gazdaságosabb eljárásai (2003).
- Ógáin, O. N., Li, J., Tajber, L., Corrigan, O. I., Healy, A. M.: *Int. J. Pharm.* 405, 23–35 (2011).
- Islam, N., Gladki, E.: *Int. J. Pharm.* 360, 1–11 (2008).
- Gradon, L., Sosnowski, T. R.: *Adv. Powder Technol.* DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.apt.2013.09.012>. (2013).
- Sussich, F., Cesáro, A.: *Carbohydr. Res.* 343, 2667–2674 (2008).
- Maurya, M., Murphy, K., Kumar, S., Shib, L., Lee, G.: *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 59, 565–573 (2005).
- Maurya, M., Murphy, K., Kumar, S., Mauerera, A., Lee, G.: *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 59, 251–261 (2005).

10. Moran, A., Buckton, G.: *Int. J. Pharm.* 343, 12-17 (2007).
11. Murugappan, S., Patil, H. P., Kanojia, G., ter Veer, W., Meijerhof, T., Frijlink, H. W., Huckriede, A., Hinrichs, W. L. J.: *Eur. J. Pharm. Biopharm* 85, 3, A, 716-725 (2013).
12. Nakamura, T., Sekiyama, E., Takaoka, M., Bentley, A. J., Yokoi, N., Fullwood, N. J., Kinoshita, S.: *Biomaterials* 29, 3729-3737 (2008).
13. Crowe, J. H., Tablin, F., Wolkers, W. F., Gousset, K., Tsvetkova, N. M., Ricker, J.: *Chem. Phys. Lipids* 122, 41-52 (2003).
14. Parti, R., Schoppmann, A., Lee, H., Yang, L.: *Haemophilia* 11, 492-496 (2005).
15. Jójárt-Laczkovich, O., Szabó-Révész, P.: *Drug Dev. Ind. Pharm.*, (2011).
16. Kim, M. S., Jin, S. J., Park, H. J., Song, H. S., Hwang, S. J.: *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 69, 454-465 (2008).
17. Vollenbroek, J., Hebbink, G. A., Ziffels, S., Steckel, H.: *Int. J. Pharm.* 395, 62-70 (2010).
18. DiNuzio J. C., Brough C., Hughey J. R., Miller, D. A., Williams III, R. O., McGinty, J. W.: *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 74, 340-351 (2010).
19. Chieng, N., Rades, T., Saville, D.: *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 68, 771-780 (2008).
20. Szakonyi, G., Zelkó, R.: *Acta Pharm. Hung.* 80, 121-127 (2010).
21. Maas, S. G., Schaldach, G., Littringer, E. M., Mescher, A., Griesser, U. J., Braun, D. E., Walzel, P. E., Urbanetz, N. A.: *Powder Technol.* 213, 1-3, 27-35 (2011).
22. Jójárt-Laczkovich, O., Szabó-Révész, P.: *J. Therm. Anal. Calorim.* 102, 243-247 (2010).
23. Szabóné-Révész P., Laczkovich O., Erős I.: *Acta Pharm. Hung.* 74, 39-44 (2004).
24. Jójártné Laczkovich O., Szabóné Révész P.: *Magy. Kém. Foly.* 116, 101-104 (2010).
25. Mártha Cs., Jójártné Laczkovich O., Szabóné Révész P.: *Acta Pharm. Hung.* 81, 37-42 (2011).
26. Mártha, Cs., Kürti, L., Farkas, G., Jójárt-Laczkovich, O., Szalontai, B., Glässer, E., Deli, M. A., Szabó-Révész, P.: *Eur. Polym. J.* 49, 2426-2432 (2013).
27. <http://www.ich.org/products/guidelines/quality/article/quality-guidelines.html> [2013.12.02] ICH Q1A(R2) International Conference on Harmonization Q1A(R2) Stability Testing of New Drug Substances and Products (2003).

Érkezett: 2014. március 7.



## Újabb adatok izovanillin típusú molekulák édes ízének molekuláris hátteréről

KÁLMÁN NOÉMI, MAGYARNÉ-JESZENSZKI ERZSÉBET,  
KURTÁN TIBOR ÉS ANTUS SÁNDOR\*

Debreceni Egyetem Szerves Kémiai Tanszék, 4010 Debrecen, Pf.20

\*Kapcsolattartó e-mail címe: antus.sandor@science.unideb.hu

### Summary

Kálmán, N., Magyarné-Jeszenszki, E., Kurtán T. and Antus S.: *New facts about the molecular background of isovanilline-type sweeteners.*

As a continuation of our studies on the relationship between structure and sweet taste of isovanilline-type sweeteners, (3-hydroxy-4-methoxy)benzyl-benzoate (**17**) and -salicylate (**17c**), analogues of dihydrochalcone-type sweetener analogues of (+)-phyllodulcin [(+)-**5**] and CH-401 (**14c**) have been synthesized. Surprisingly, **17c** has been found to be tasteless, while **17e** was slightly sweet. These observations could be explained by the current hypothesis on the receptor model for isovanilline-type sweet derivatives.

**Keywords:** phyllodulcin, CH-401 dihydrochalcone, structure-sweetness relationship, benzoic- and salicylic acid-(3-hydroxy-4-methoxy)benzyl-benzoate and -salicylate

### Összefoglalás

Az izovanillin típusú édesítőszer szerkezet-édes íz összefüggés vizsgálatához kapcsolódó kutatásaink folytatásaként a phyllodulcin- és a CH-401 dihidrokalkon típusú édesítőszer analógjait, a (3-hidroxi-4-metoxi)benzil benzoátot (**17e**) és -szalicilátot (**17c**) állítottuk elő. Meglepő módon azt találtuk, hogy **17c** íztelen, míg a **17e** pedig kissé édes ízű vegyület. Megfigyelésünket a vanillin származékok körében jelenleg elfogadott édes íz receptor modell alapján értelmeztük.

**Kulcsszavak:** phyllodulcin, CH-401 dihidrokalkon, szerkezet-édes íz összefüggés, (3-hidroxi-4-metoxi)benzil-benzoát és -szalicilát

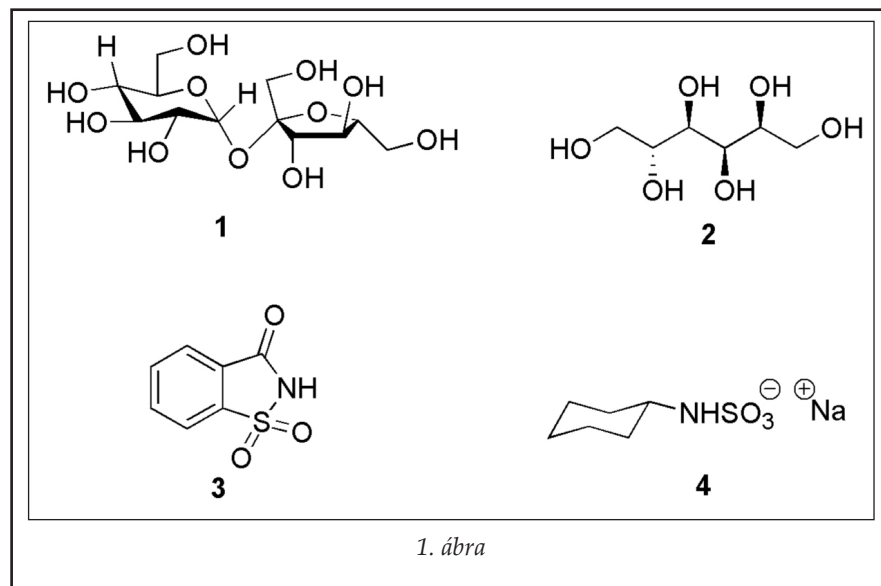
### 1. Bevezetés

Az egészségtudatos életmód fontos szerepet tölt be egészségünk megőrzésében, mivel a kalóriadús táplálkozás és a mozgásszegény életmód kiváltó okként számos betegség kialakulásában tetten érhető. Ezek egyike a II. típusú cukorbetegség, az ún. *non-insulindependens diabetes mellitus* (NIDDM), amely népbetegségnek számít a világ számos iparilag fejlett országában, és ha a táplálkozási szokások gyökeresen nem változnak meg, akkor e betegségben érintettek száma még a mértéktartó becslések szerint is számottevően nőni fog. A WHO adatai szerint a regisztrált betegek száma jelenleg meghaladja a 171 milliót és 2030-ra akár a 366 milliót is elérheti [1]. Így a jövőben joggal várható a csökkentett kalóriájú és diétás élelmiszerek iránti kereslet rohamos növekedése.

A gyakorlatban alkalmazott édesítőszer hármas alapvető típusát különböztetjük meg, és így természetes eredetű [pl. nád vagy répacukor, a szacharóz (**1**)], félszintetikus [D-szorbit (**2**)] és a mesterséges édesítőszerokről beszélhetünk. A legrégibben ismert és az élelmiszeriparban napjaink-

ban is nagy mennyiségben használt kalóriaszegény mesterséges édesítőszer a szacharin (**3**) és a ciklamát (**4**), melyek rendkívül alacsony előállítási költsége a mellékizük ellenére e vegyületeket szinte kizoríthatatlanná teszi az édesítőszer piacáról (**1. ábra**).

Az elmúlt fél évszázadban ennek ellenére jelentős kutatások folytak természetes eredetű, édes ízű kalóriaszegény vegyületek izolálása és szerkezet-felderítése területén. Japán kutatók 1929-ben közölték, hogy a *Hydrangea thunbergii* Sieboldi leveléből izolált 3,4-dihidroizokumarin származék, a (+)-phyllodulcin (**5**) édes ízű vegyület [2] és Yamato és munkatársainak a vizsgálata szerint 400-szor [3], Suzuki és munkatársai szerint pedig 600-800-szor [4] édesebb a szacharóznál. Egy vegyület édességi foka (Rs) megadja, hogy hány gramm szacharózt (**1**) kell adott vízmennyiségben feloldani ahhoz, hogy az oldat ugyanolyan édes ízű legyen, mint az édesítőszer 1 grammjának oldata azonos vízmennyiségben. A szacharóz édességi foka ennek alapján 1 [5]. A (+)-phyllodulcin (**5**) ózonidos lebontása révén, hamarosan az is ismertté vált, hogy a kiralitáscentrum abszolút kon-



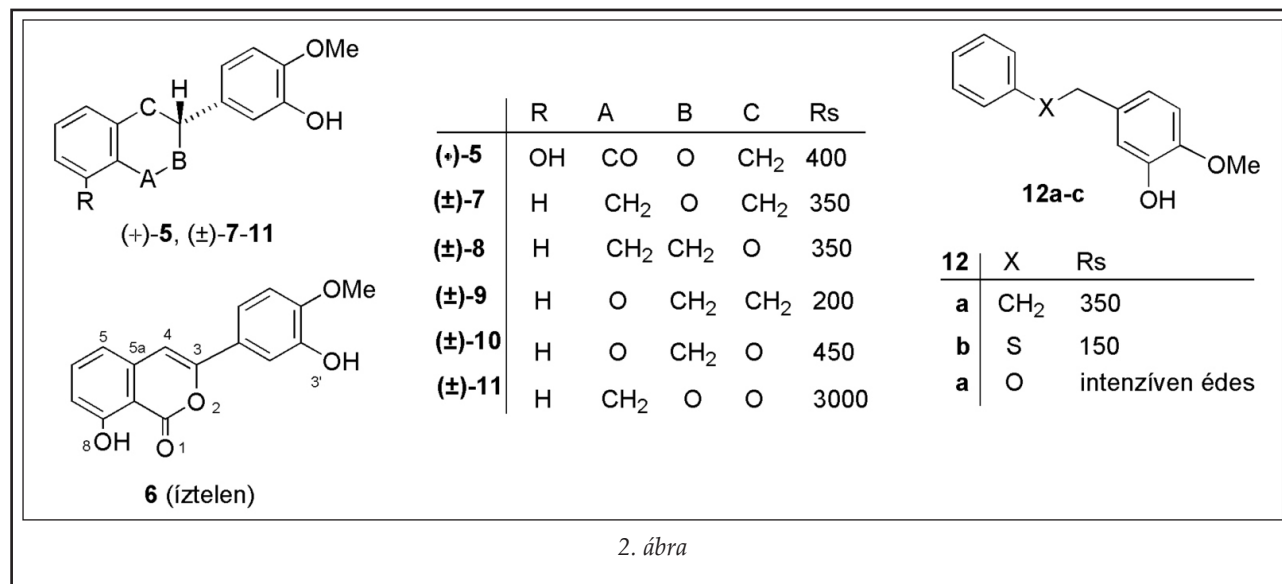
[(±)-7 → (±)-10] a molekula édes ízét jelentősen fokozta [12]. Meglepő módon az 1,4-benzodioxán váznak 1,3-benzodioxánnal való helyettesítése a szacharóznál 3000-szer édeesebb izovanillin származékhoz [(±)-11] vezetett [13]. Megemlítendő, hogy az 1-(3-hidroxi-4-methoxyphenyl)-2-feniletán (12a) [7], valamint a 12b tioéter [3] és 12c éter [7] analóg származékai is intenzíven édes ízű vegyületek (2. ábra).

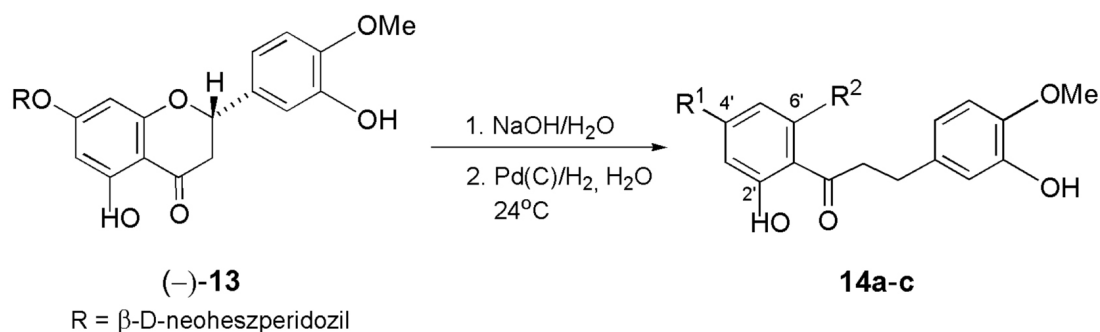
1963-ban közöltük, hogy a különböző citrus növények (naracs, grapefruit) héjából Horowitz és Gentili által izo-

figurációja (R) [6]. A hatás-szerkezet összefüggés vizsgálatok azt is feltárták, hogy (a) az édes ízért elsősorban a 3-hidroxi-4-metoxifenil csoport a felelős, (b) a 3',8-dihidroxi-4'-metoxizokumarin (6) [7] és a (-)-(S)-phyllodulcin is íztelen vegyületek [8]. Megemlítendő, hogy a racém phyllodulcin [(±)-5] is édes ízű [2,7], és a karbonil, valamint az azal *peri*-helyzetben lévő hidroxil csoportjának együttes elhagyását [(±)-5 → (±)-7] ízvesztés kísérte [9]. Ugyanakkor a (±)-7 izokromán származék oxigénatomjának a benzil helyzetű metilén csoporttal való cseréje [(±)-7 → (±)-8] nem okozott ízváltozást a (±)-8 flaván származék esetén [10]. Jelentősebb ízcsökkenéssel járt (±)-8 flaván oxigénatomjának a benzilhelyzetű metilén csoportjával történt felcserélése [(±)-8 → (±)-9] [11]. Ugyanakkor az 1,4-benzodioxán gyűrűrendszer kialakítása

lált keserű ízű (-)-neohesperidinből (13) két lépésben nyert 3-hidroxi-4-metoxifenil csoportot tartalmazó dihidrokalkon származék (14a) édes ízért ( $R_s = 950$ ) [14,15] e molekula 2'-dihidrokalkon része (14b) a felelős [16,17] (3. ábra). A 4'-β-D-neohesperidoziloxi- és a 6'-hidroxil csoport csak e molekula vízdoldhatóságát biztosítja. A 6'-hidroxil csoport elhagyásával és a 4'-β-D-neohesperidozil csoportnak 3-szulfonilpropillal való helyettesítésével kapott dihidrokalkon nátrium-sója (14c, CH-401) az 1%-os szacharóz vizes oldatánál 1500 (± 300)-szor édesebbnek bizonyult [18,19].

Jóllehet a CH-401 jelű molekula hazánkban, USA-ban, Angliában, Franciaországban és a Szovjetunióban is szabadalmi oltalmat kapott, a kiváló toxikológiai ( $LD_{50} > 1 \text{ g/testesúly kg}$ ) és számos ké-





14	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	Rs
a	$\beta$ -D-neoheszperidozil-O-	OH	950
b	H	H	
c	$-\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{SO}_3^-\text{Na}^+$	H	1500

3. ábra

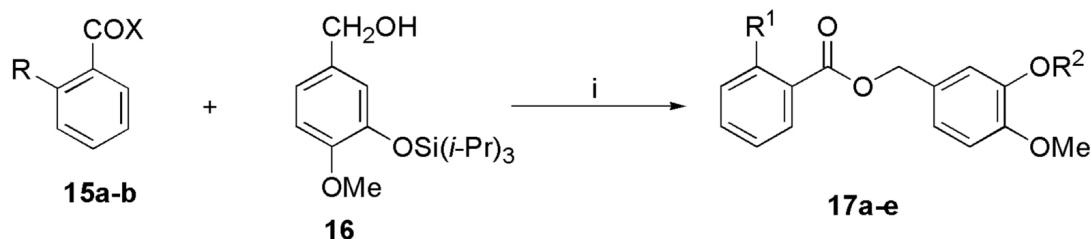
szítményben tapasztalt kedvező organoleptikus tulajdonságai, valamint a savas és bázikus közegben és termikus behatásra (<300 °C) mutatott stabilitása ellenére, élelmiszeripari bevezetésére már nem került sor.

E területen végzett kutatásaink folytatásaként célul tűztük ki, az (R)-(+)-phyllodulcin [(+)-5] és a CH-401 dihidrokalkon (14c) 17c,e oxigén-analogjainak a szintézisét, azt remélve, hogy organoleptikus vizsgálatukkal újabb információt ka-

punk az izovanillinek édes ízének molekuláris hátteréről.

### Eredmények és értékelésük

A (3-hidroxi-4-metoxi)benzil szalicilátot (17c) acetilszalicilsavból (15a) és az izovanillinből két lépésben nyert 4-metoxi-3-[tri(*i*-propil)szililoxi]benzil-alkoholból (16c) kiindulva a 17a észterszármazékon keresztül három lépésben (15a + 16c →



15	R <sup>1</sup>	X
a	OAc	OH
b	H	Cl

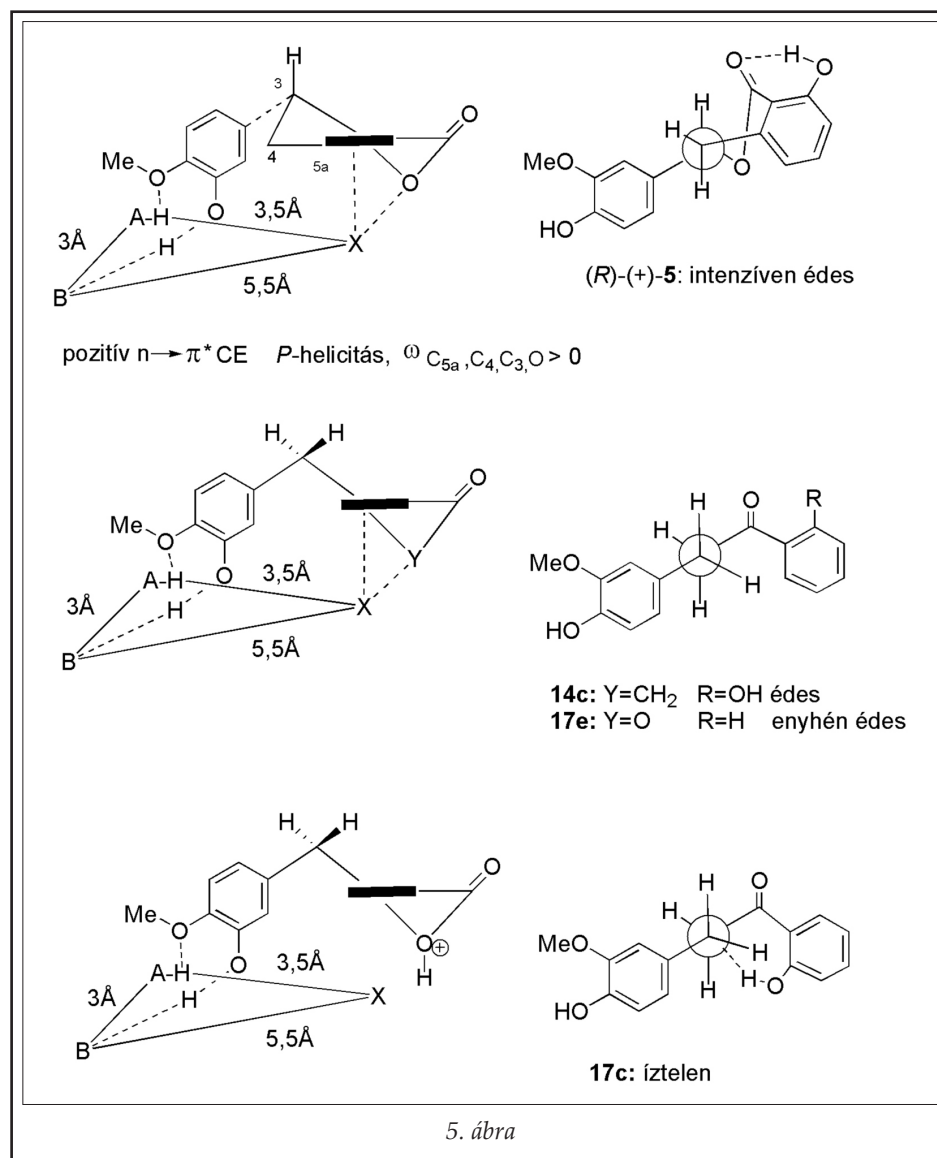
i: **15a+16**, Ph<sub>3</sub>P, DIAD, THF, 24°C; **15b+16**, piridin, 24°C

ii: Bu<sub>4</sub>N<sup>+</sup>F<sup>-</sup>, THF, 24°C

iii: vízmentes MeOH, NaOMe, 24°C

17	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>
ii → a	OAc	Si( <i>i</i> -Pr) <sub>3</sub>
iii → b	OAc	H
iii → c	OH	H
ii → d	H	Si( <i>i</i> -Pr) <sub>3</sub>
ii → e	H	H

4. ábra



17a  $\rightarrow$  17b  $\rightarrow$  17c állítottuk elő. A (4-metoxi-3-hidroxi) benzil-benzoáthoz (17e) pedig a 4-metoxi-3-[tri(*i*-propil)szililoxi] benzil-alkohol (16) benzoilezését követő deszililezéssel (16  $\rightarrow$  17d  $\rightarrow$  17e) jutottunk [20] (4. ábra).

E vegyületek azonban vízben nagyon rosszul oldódtak, ezért 5-5 mg-ot 0.5 ml 96%-os etanolban oldottuk fel, majd az opálosodásig frissen desztillált vízzel (4 ml) hígítva stabil oldatokat kaptunk és ezeket ízleltük.

Az a tény, hogy az (R)-(+)-phyllodulcin (5) intenzíven édes ízű vegyület, ugyanakkor az enantiomerje [(-)-(S)-5] íztelen, egyértelműen arra utal, hogy oldatban a jobbrafogató enantiomer heterogyűrűjének abszolút konformációja is meghatározó szerepet játszik az édes íz receptorhoz való kötődésben. Kiroptikai vizsgálataink szerint a (+)-phyllodulcin (5) ECD szinképében a dihidro-

zokumarin kromofor karbonil  $n \rightarrow \pi$  átmeneténél a Cotton-effektus pozitív [21], így a kondenzált heterogyűrűnek  $P$ -helicitású félszék konformációja van [22], melyhez a 3-hidroxi-4-metoxifenilcsoport *ekvatoriális* állásban kapcsolódik (5. ábra). Ez a molekula és a CH-401 dihidrokalkon – mint azt a Dreiding modelljük vizsgálata mutatta – egymáshoz nemcsak szorosan illeszthető, de a megfelelő funkciós csoportjaik távolsága kielégíti a Kier [23], majd később Merlini és munkatársai [24,25] által módosított Schallenberger-Acree féle [26] édes íz receptor modell paramétereit is [AH-B = 3 Å, AH-X = 3.5 Å és a B-X = 5.5 Å (ahol X = O vagy CH<sub>2</sub>), valamint a ( $\pm$ )-7-10 O-heterociklosos és a 12a-c nyílt láncú vanillin származékok esetén az X = másik aromás gyűrű középpontja]. Ezen adatok alapján azt vártuk, hogy a 17c konformációsan flexibilis szalicilsav származék

– hasonlóan a CH-401-hez (14c) – az (R)-(+)-phyllodulcinnál (5) édesebb molekula. Az organoleptikus vizsgálataink azonban azt mutatták, hogy a 17c szalicilsav származék teljesen íztelen, míg a benzoészav-származék (17e) pedig enyhén édes ízű vegyület. E meglepő eredmény okát abban látjuk, hogy 17c esetében – eltérően a CH-401 (14c)-től – a *peri*-helyzetű fenolos hidroxil csoport nem az észter karbonil csoportjával, hanem az összekötő elemként szolgáló oxigénjével alakítja ki a hattagú kelát gyűrűt, és ez akadályozza meg az édes íz receptorhoz való kötődését. Ennek hiányában már lehetőség van az ún. három pontos érintkezésre, és így a 17e benzoészav származék, ha enyhén is, de már édes ízű vegyület.

Az édes íz receptor térszerkezetének alaposabb megismerésére irányuló további vizsgálataink folyamatban vannak.

## Köszönetnyilvánítás

A kutatásainkat az OTKA támogatta (K-81701), melyért e helyütt is köszönetünket fejezzük ki. *Kálmán Noémi* IV. éves gyógyszerészhallgató pedig a TÁMOP - 4.2.4.A/2-11/1-2012-0001 számú 'Nemzeti Kiválósági Program – Hazai hallgatói, illetve kutatói személyi támogatást biztosító rendszer kidolgozása és működtetése konvergencia program' című kiemelt projekt által nyújtott ösztöndíjért mond köszönetet.

## IRODALOM

- [1] Green, A., Hirsch, N.C., Pramming, S.K.: *Diabetes-Metab. Res. Rev.* 19, 3-7 (2003)
- [2] Asahina, Y., Asano, J.: *Ber. Dsch. Chem. Ges.* 62, 171-177 (1929)
- [3] Yamato, M., Hashigaki, K., Honda, E., Sato, K., Koyama, T.: *Chem. Pharm. Bull.* 25, 695-699 (1977)
- [4] Suzuki, H., Ikeda, T., Matsumoto, T., Noguchi, M.: *Agric. Biol. Chem.* 41, 719-720 (1977)
- [5] International Standard Recommendation (1975): Sensory analysis. Determination of sensitivity of taste. ISO/TC34, ISO/DIS 3972
- [6] Arakawa, H.: *Bull. Chem. Soc. Jap.* 33, 200-202 (1960)
- [7] Yamato, M., Hashigaki, K., Kuwano, Y., Kayama, T.: *Yakugaku Zasshi.* 92, 535-538 (1972)
- [8] Zehnter, R., Gerlach, H.: *Tetrahedron: Assym.* 6, 2779-2786 (1995)
- [9] Yamato, M., Hashigaki, K., Uenishi, J., Yamakawa, I., Sato, N., Koyama, T.: *Chem. Pharm. Bull.* 23, 3101-3105 (1975)
- [10] Dick, W.E.: *J. Agric. Food. Chem.* 29, 305-312 (1981)
- [11] Arnoldi, A., Bassoli, A., Merlini, L., Ragg, E.: *J. Chem. Soc. Perkin Trans 2.* 1399-1406 (1991)
- [12] Arnoldi, A., Camarda, I., Merlini, L.: *J. Agr. Food Chem.* 34, 339-344 (1986)
- [13] Dick, W.E., Hodge, J.E.: *J. Agric. Food Chem.* 26, 723-725 (1978)
- [14] Horowitz, R.M.; Gentili, B.: *U.S. Pat.* 3 087 821 (1963); *Chem. Abstr.* 59, 11650c (1963)
- [15] Horowitz, R.M.; Gentili, B.: *J. Agric. Food. Chem.* 17, 696-700 (1969)
- [16] Farkas, L., Nógrádi, M., Gottsegen, Á., Antus, S.: *Hung. Pat.* 163.394 (1971)
- [17] Antus, S., Farkas, L.; Gottsegen, Á., Nógrádi, M.; Strelisky, J.; Pfliegel, T.: *Acta Chim. Acad. Sci. Hung.* 98, 231-240 (1978)
- [18] Farkas, L., Nógrádi, M., Pfliegel, T., Antus, S., Gottsegen, Á.: *Hung. Pat.* 168.495 (1974)
- [19] Antus, S., Farkas, L., Gottsegen, Á., Nógrádi, M., Pfliegel, T.: *Acta Chim. Acad. Sci. Hung.* 98, 225-230 (1978)
- [20] (3-hidroxi-4-metoxi)benzil-szalicilát (**17c**):  $C_{15}H_{14}O_5$  ( $M_w$ : 274.2), fehér kristályok, op. 105-107°C,  $^1H$ -NMR ( $CDCl_3$ , 350 MHz)  $\delta$  = 3.87 (s, 3H, OMe), 5.27 (s, 2H,  $OCH_2$ ), 5.72 (s, 1H, 3-OH), 6.85 (m, 2H, 5',6'-H), 6.95 (m, 2H, 4,5-H), 7.03 (d, J = 3.2 Hz, 1H, 2'-H), 7.43 (d, J = 7.2 Hz, 1H, 3-H), 7.86 (d = 7.2 Hz, 1H, 6-H), 13,12 (s, 1H, 2-OH); GC-MS: Rt= 10.31 min., m/z: 274.1 ( $M^+$ ), 137.1 ( $B^+$ ). (3-hidroxi)-4-metoxi)benzil-benzoát (**17e**):  $C_{15}H_{14}O_4$  ( $M_w$ : 258.3) fehér kristály, op: 39-40°C,  $^1H$ -NMR ( $CDCl_3$ , 350 MHz)  $\delta$  = (3.88 (s, 3H, OMe), 5.27 (s, 2H,  $OCH_2$ ), 5.83 s, 1H, OH), 6.84 (d, J = 8.60 Hz, 1H, 5'-H), 6.95 (dd, J = 8.60 és 2 Hz, 6'-H), 7.05 (d, J = 2 Hz, 2'-H), 7.42 (m, 2H, 3,4-H), 7.54 (m, 1H, 5-H), 8.06 (d, J = 7.2, 2H, 2,6-H); GC-MS: Rt= 9.93 min., m/z: 258.1 ( $M^+$ ), 105.1 ( $B^+$ ). A részletes közlemény összeállítása a *Monatshefte der Chem*-ben történő közlésre folyamatban van.
- [21] Antus, S., Snatzke, G., Steinke, I.: *Liebigs Ann. Chem.* 2247-2261 (1983)
- [22] Kurtán, T., Antus, S., Pescitelli, G.: Electronic CD of benzene and other aromatic chromophones for determination of absolute configuration. In *Berova, N., Prasad, L., Nakanishi, K., Wood, R.W.* (eds.): *Comprehensive chiroptical spectroscopy*. Vol. 2. Wiley, 2012. pp. 73-114
- [23] Kier, L.B.: *J. Pharm. Sci.* 61, 1394-1397 (1972)
- [24] Arnoldi, A., Bassoli, A., Merlini, L., Ragg, E.: *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2* 1399-1046 (1991)
- [25] Bassoli, A., Merlini, L., Morini, G., Vedani, A.: *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2.* 1449-1454 (1998)
- [26] Shallenberger, R.S., Acree, F.E.: *Nature* 216, 480-482 (1967).

Érkezett: 2014. március 7.





## Pajzsmirigyhormonok és előanyagaik. II. Részecske-specifikus tulajdonságok<sup>1</sup>

TÓTH GERGŐ\*, NOSZÁL BÉLA

Semmelweis Egyetem, Gyógyszerészi Kémiai Intézet, Magyar Tudományos Akadémia Kábító-  
és Dopping-szer-tudományi Társult Kutatócsoport

1092 Budapest, Hőgyes Endre utca 9.

\*Levelezési cím: gergo.toth85@gmail.com

### Summary

Tóth, G., Noszál, B.: *Thyroid hormones and their precursors. II. Species-specific properties*

This paper surveys the species-specific physico-chemical parameters (basicity and lipophilicity) and related biological functions of thyroid hormones (thyroxine, liothyronine and reverse liothyronine) and their biological precursors (tyrosine, monoiodotyrosine and diiodotyrosine).

The protonation macroconstants were determined by <sup>1</sup>H NMR-pH titrations while the microconstants were determined by a multimodal spectroscopic-deductive methodology using auxiliary derivatives of reduced complexity. Our results show that the different number and/or position of iodine are the key factors to influence the phenolate basicity. The ionization state of the phenolate site is crucial in the biosynthesis and protein binding of thyroid hormones. The role of the protonation state in the receptor binding was investigated by an *in silico* docking method. Microspecies of thyroid hormones were docked to the thyroid hormone receptor isoforms. Our results quantitate at the molecular level how the ionization stage and the charge distribution influence the protein binding. The anionic form of the carboxyl group is essential for the protein binding, whereas the protonated form of the amino group loosens it. The protonation state of the phenolate plays a role of secondary importance in the receptor binding. The combined results of docking and microspeciation studies show that microspecies of the highest concentration at the pH of blood are not the strongest binding ones.

The site-specific lipophilicity of our investigated molecules was determined with the measurement of distribution coefficients at different pH using carboxymethyl- and O-methyl-derivatives to mimic the partition of some of the individual microspecies. Correction factors were determined and introduced. Our data show that the iodinated aromatic ring system is the definitive structural element that fundamentally determines the lipophilicity of thyroid hormones, whereas the protonation state of the aliphatic part is essential in receptor binding. The membrane transport of thyroid hormones can be well interpreted in terms of the site-specific lipophilicity. At physiological pH these biomolecules are strongly amphipathic due to the lipophilic aromatic rings and hydrophilic amino acid side chains which can well be the reason why thyroid hormones cannot cross membranes by passive diffusion and they even become constituents of biological membranes.

The site-specific physico-chemical characterization of the thyroid hormones is of fundamental importance to understand their (patho)physiological behavior and also, to influence the therapeutic properties of their drug candidate derivatives at the molecular level.

**Keywords:** thyroxine, microspeciation, thyroid hormone receptor, lipophilicity, membrane transport

### Összefoglaló

Jelen közleményünkben a pajzsmirigyhormonok (tiroxin, liotironin, reverz liotironin) és előanyagaik (tirozin, monojódtirozin, dijódtirozin) részecske-specifikus bázicitásának és lipofilitásának meghatározását és az e paraméterekből levonható biológiai következtetéseket foglaljuk össze, főként saját vizsgálataink alapján.

A vegyületek protonálódási makroállandóit <sup>1</sup>H NMR-pH titrálással, míg a mikroállandókat csökkentett számú protonálható csoporttal rendelkező származékvegyületek felhasználásával, kombinált spektroszkópai-deduktív módszerrel határoztuk meg. A kapott mikroállandók azt mutatták, hogy az eltérő számú és/vagy helyzetű jódatom a molekulákban legnagyobb mértékben a fenolát bázicitását befolyásolja. A fenolátcsoport eltérő ionizációs állapotai jelentős szerepet játszanak a pajzsmirigyhormonok bioszintézisében és fehérjékhez való kötődésében. A báziscentrumok protonálódási állapotának szerepét a receptorkötődésben *in silico* dokkolással tisztáztuk. A pajzsmirigyhormonok összes mikrorészecskéit a pajzsmirigyhormon-receptor két izoformájához dokkoltuk. Eredményeink azt mutatták, hogy a ligand és a receptor közötti kölcsönhatás kialakításában az aminosav oldallánc protonáltsági állapota meghatározó. Megállapítható továbbá, hogy nem az a részecske rendelkezik a legerősebb kötődési képességgel, mely a vér pH-ján legnagyobb koncentrációban fordul elő.

Az egyes mikrorészecskék lipofilitását karboximetil- és O-metilszármazékvegyületek felhasználásával, különböző pH-kon mért megoszlási hányadosok meghatározásával végeztük. A kémiai módosítás hatását korrekciós faktor bevezetésével vettük figyelembe. Eredményeink szerint a pajzsmirigyhormonok lipofilitásának kialakításában a döntő szerkezeti elem a jódozott aromás gyűrűrendszer, az alifás rész protonálódása csekély hatást gyakorol a megoszlási hányadosokra. A részecske-specifikus lipofilitásokkal a vegyületek membrántranszportja molekuláris szinten magyarázható. Fiziológias pH-n a pajzsmirigyhormonok amfifil tulajdonságúak a lipofil aromás gyűrű és a hidrophil aminosav oldallánc miatt, ami azt eredményezi, hogy a molekulák csak szállítófehérje segítségével képesek átjutni a membránokon.

A vegyületek részecske-specifikus fizikai-kémiai állandóinak ismerete szükséges a pajzsmirigyhormonok (pato)fiziológias viselkedésének molekuláris szintű megértéséhez és gyógyászati befolyásoláshoz.

**Kulcsszavak:** tiroxin, mikrospeciáció, pajzsmirigyhormon-receptor, lipofilitás, membrántranszport

<sup>1</sup> A közlemény Tóth Gergő Ph.D. értekezésének része

## Bevezetés

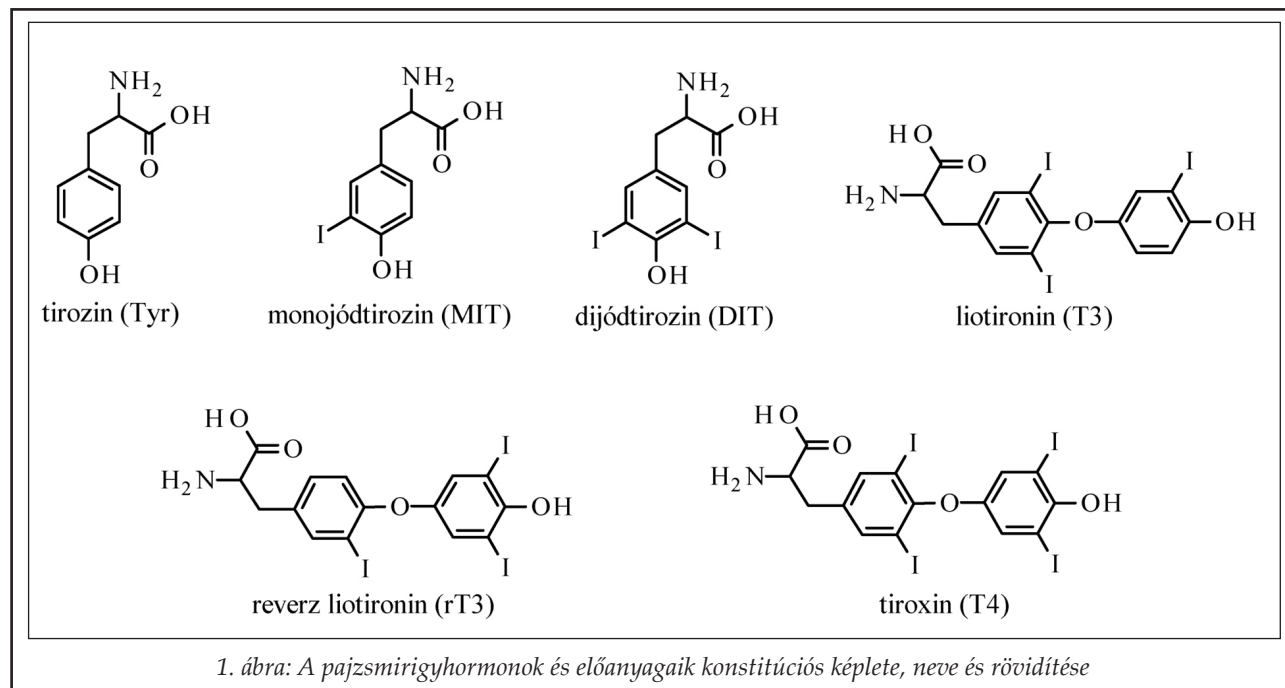
A bio- és gyógyszermolekulák szervezetben lezajló, többnyire nagy specifitású reakciói akkor mennek végbe, ha a részecskék megfelelő mikroszkopikus protonáltsági, konformációs állapotban vannak. Ezen részecskék koncentrációja és a kapcsolódó egyensúlyi állandók a mikrospeciáció segítségével határozhatók meg. Az egyes mikrorészecskék nehezen megfogható kémiai entitások. Egymásba való folyamatos átalakulásuk miatt átlagos egyedi élettartalmuk a  $10^{-9}$  másodperces nagyságrendbe esik, emiatt semmilyen ma ismert elválasztástechnikai módszerrel nem különíthetők el egymástól. Ennek ellenére egyedi fizikai-kémiai paraméterekkel jellemezhetők, a biológiai folyamatokban saját, önálló formában vesznek részt. A protonáltsági izomerek (pl. az aminosavak ikerionos és töltésmentes formája) csak abban különböznek egymástól, hogy a kötött protont eltérő báziscentrumon hordozzák, biológiai szerepük mégis eltérő. Széles körben elterjedt nézet szerint a membránon keresztüli transzportfolyamatokban a töltésmentes, míg a receptorkötődésben inkább az ikerionos forma vesz részt. A mikroszkopikus egyensúlyi és kinetikai paraméterek ismerete alapvető a biokémiai és analitikai folyamatok molekuláris szintű megértéséhez, valamint a patobiokémiai folyamatok terápiás befolyásolásához [1-3].

A legfontosabb pajzsmirigyhormonok a tiroxin (T4), a liotironin (T3) és a reverz liotironin (rT3). E

vegyületek a pajzsmirigyben a tirozin (Tyr) jódozása után monojódtirozin (MIT) és dijódtirozin (DIT) molekulák összekapcsolódásával keletkeznek. A vizsgált vegyületek konstitúciós képlete az 1. ábrán látható.

A pajzsmirigyhormonok élettani hatása régóta ismert: jelenlétük elengedhetetlen az egészséges testi és szellemi fejlődéshez, a kiegyensúlyozott pszichikai állapothoz [4]. A hormonok és előanyagaik bázicitásának és lipofilitásának jellemzése hiányos az irodalomban, annak ellenére, hogy a vegyületekről közlemények tízezrei jelentek meg, emellett pontos fizikai – kémiai jellemzésük elengedhetetlen a terápiás hatás molekuláris szintű megismeréséhez, valamint, az egyes, rokon hatású gyógyszeranyagok farmakokinetikai és farmakodinámiai tulajdonságainak kvantifikálásához [5].

A hatóanyagok szerkezetbeni sorsát befolyásoló legfontosabb fizikai-kémiai paraméterek a protonálódási makro- és mikroállandók, valamint a lipofilitás. A protonálódási makroállandók a molekula egészét jellemzik, az egyedi funkciócsoportok sav-bázis karakteréről a protonálódási mikroállandók adnak információt. A protonálódási állandók segítségével kiszámítható, hogy egy adott biológiai közegre jellemző pH-n milyen mértékben fordul elő egy vegyület különböző mértékben protonált formája. Ezáltal előre jelezhető, hogy a molekula a szervezet mely kompartmentjéből fog legnagyobb valószínűséggel felszívódni. A receptorhoz való kötődést az biztosítja, hogy a ligandum farmakofór csoportjainak típusai



és azok ionizációs állapotai megfelelőek a kölcsönhatás kialakulásához a receptorkötőhely aminosav oldalláncaival. Egy receptor – ligand kötődés tehát csoportspecifikus bázicitásadatok ismeretében eredményesebben tanulmányozható. Analitikai kémiai szempontból pedig a protonálódási állandók ismerete elengedhetetlen az egyes elválasztások, például a kapilláris elektroforézis módszerek tervezéséhez [6].

A protonálódási makroállandók meghatározására olyan módszerek alkalmasak, melyekben a mért fizikai – kémiai mennyiség pH-függő változása a molekula  $H^+$ -felvételével kapcsolatban áll.

Vegyületeink protonálódási makroállandóit  $^1H$  NMR – pH titrálással határoztuk meg. NMR – pH titrálás során protonálódás hatására a báziscentrum körül csökken az elektronsűrűség, ezért a közeli magok diamágneses árnyékolása, így kémiai eltolódása is megváltozik. E módszer általában akkor is alkalmazható a leggyakrabban alkalmazott potenciometriával szemben, ha a vizsgált anyag tartalmaz szennyezőt, vagy a mérés során bomlást szenved. További előnye, hogy a vizsgálathoz nem szükséges a mérendő anyag pontos koncentrációjának ismerete, illetve megfelelő indikátormolekulák alkalmazásával szélsőségesen alacsony ( $\log K < 2$ ) vagy magas ( $\log K > 12$ ) protonálódási állandók is meghatározhatók [7].

Makroszkópikus titrálási görbékből azonban általában nem lehet mikroállandókat számolni (kivételt képeznek bizonyos szimmetrikus molekulák). Szükség van valamilyen többletinformációra, ami lehet rokon szerkezetű vegyület bázicitásadata (deduktív módszer), vagy valamilyen spektroszkópiai méréssel nyert információ, amelyből számítható az egyes csoportok protonáltsági fokát jellemző függvény. Vizsgált vegyületeinkben egyik csoport protonfelvétele sem követhető szelektíven  $^1H$  NMR-pH titrálással, ezért a mikroállandók meghatározására a deduktív módszert alkalmaztuk, illetve a Tyr, MIT és T3 esetében a fenolátcsoportra jellemző protonálódási mikroállandót ( $k^o$ ) UV-pH titrálással is meghatároztuk.

A deduktív módszer során a meghatározandó molekulához szerkezetileg igen közeli, de kevesebb számú protonálható csoporttal rendelkező vegyület protonálódási makroállandóját/makroállandóit építjük be a mikrospeciációs sémába, adott mikroállandó(k) helyére. A deduktív módszereket akkor szükséges alkalmazni, ha nem lehetséges a protonálódás csoportszelektív megfigyelése, vagy ha a mikrorészecskék között bármelyiknek a koncentrációja szélsőségesen alacsony

[1]. Ilyen esetekben ugyanis a minor részecske hozzájárulása az analitikai jelhez olyan csekély, hogy spektroszkópiai módszerekkel nem, vagy csak nagy hibával kaphatunk róla információt. A vizsgált molekuláink teljes mikrospeciációjának meghatározásához szükségünk volt csökkentett számú protonálható csoporttal rendelkező származékvegyületekre. A legegyszerűbben a  $-COOH$  csoport „modellezhető”: metil-észterként, illetve az  $-OH$  csoport metil-éterként [8]. A deduktív módszerek másik csoportja azon alapul, hogy egy molekula két csoportjának kölcsönhatási tényezőjét egy másik molekula (modellvegyület) hasonló molekularészében mért értékkel azonosítjuk. A kölcsönhatási tényezők ugyanis a molekula többi részétől legkevésbé függő paraméterek, így egy adott vegyületcsalád analóg molekularészei között a legkisebb torzítással átvihető sav-bázis mérőszámok [9].

A gyógyszermolekulák membránon való átjutási képességének becslésében a lipofilitás játszik döntő szerepet, amelyet a gyógyszerészetben leggyakrabban az oktanol/víz megoszlási hányados logaritmusával számszerűsítene (logP). E paraméter a szerkezet-hatás összefüggések tanulmányozásában is központi helyen áll [10]. Nyilvánvaló, hogy a membránokon történő penetráció a semleges, töltés nélküli részecskének legkedvezőbb. Azonban, ha a semleges részecske koncentrációja a szervezet egy adott kompartmentjében, adott pH-n igen csekély, előfordulhat, hogy a molekula bruttó lipofilitásához nem a semleges részecske hozzájárulása lesz a legnagyobb. Emiatt szükséges az egyes egyedi mikrorészecskék lipofilitásának ismerete is, ami által a molekulák membránon keresztüli transzportja szubmolekuláris szinten válik tanulmányozhatóvá. Az oktanol-víz megoszlási hányados ismerete emellett elengedhetetlen egyes elválasztástechnikai módszerek (rétegekromatográfia, nagyhatékonyságú folyadék-kromatográfia) tervezéséhez, értelmezéséhez [11].

Híg oldatokban egy anyag valódi megoszlási hányadosán két egymással nem elegyedő oldószerben, azonos molekuláris állapotban mért koncentrációinak arányát értjük, mely adott hőmérsékleten és nyomáson, az egyensúlyi állapot elérése után konstans érték. Ennek megfelelően – egy ionizálható csoportokkal nem rendelkező molekula esetében – az alábbi összefüggéssel számíthatjuk ki a valódi megoszlási hányados értéket:

$$P = \frac{c_o}{c_v} \quad (1)$$

ahol  $P$  a valódi megoszlási hányadost, a  $c_o$  az oktanolos,  $c_v$  a vizes fázisban mérhető koncentrációt jelöli.

Ionizálható molekuláknál azonban, ahol a közeg pH-jától és a vegyület  $\log K$  értékétől függően különböző töltéssel rendelkező molekulák találhatók az oldatban, a valódi megoszlási hányadost meg kell különböztetni az adott mérési körülmények között meghatározható ún. látszólagos megoszlási hányadostól ( $\log D$ ), hiszen a különböző töltéssel rendelkező részecskék is megoszlának. A látszólagos megoszlási hányados az oldatban jelenlévő részecskék megoszlási hányadosainak a megfelelő móltörttel (relatív koncentrációval) súlyozott összege:

$$D = \sum \chi_i P_i \quad (2)$$

ahol  $\chi_i$  az egyes részecskék relatív koncentrációja a vizes fázisban,  $P_i$  pedig azok megoszlási hányadosa. A  $\log D$  vs. pH függvényt lipofilitás-pH profilnak nevezzük.

Az ionizálható/ionos vegyületek lipofilitása, különösen a protonáltsági izomereké alulreprezentált az irodalomban az olyan módszer hiánya miatt, amivel az ionos formák megoszlási hányadosa meghatározható. Kutatócsoportunk a közelmúltban kidolgozott egy deduktív módszert, amellyel az amfoter vegyületek részecske-specifikus megoszlási mikroegyensúlyai meghatározhatók [12]. E módszer segítségével több kétcsoportos gyógyszermolekula (nifluminsav [12], morfin [13], apovinkaminsav [14]) mikroszkopikus lipofilitását is meg lehetett határozni. Megfelelő számú származékvegyület felhasználásával a módszer alkalmazható háromcsoportos molekulák, így a pajzsmirigyhormonok és előanyagaik mikroszkopikus lipofilitásainak meghatározására is.

A pajzsmirigyhormonok részecske-specifikus sav-bázis paramétereinek és lipofilitásának jellemzése hozzájárul e vegyületek élettani és biokémiai tulajdonságainak jobb megértéséhez, illetve lehetőség nyílik a szerkezet-hatás összefüggések pontosabb felderítésével új gyógyszermolekulák tervezésére is.

Jelen közleményünkben célunk a pajzsmirigyhormonok részecske-specifikus fizikai-kémiai tulajdonságainak (bázicitás és lipofilitás) ismertetése, továbbá annak bemutatása, hogy ezen paraméterek hogyan befolyásolják a pajzsmirigyhormonok szervezetbeni sorsát, köztük a receptorhoz való kötődést.

## Anyagok és módszerek

### Vegyületek

A vizsgálataink tárgyát képező molekulák, a tirozin, monojódtirozin, diiodotirozin, liotironin, reverz liotironin és tiroxin a Sigma-Aldrich cég termékei voltak. A protonálódási állandók meghatározásához használt alapvegyyszereket (NaOH, NaCl, KCl, tömény sósav), az elektród kalibrációhoz és a megoszlási hányados mérésénél alkalmazott puffer komponenseket (nátrium-tetraoxalát, kálium-hidrogénftalát,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , bórax, TRIS, citromsav, dinátrium-citrát), a csökkentett protonálható csoporttal rendelkező modellvegyületek szintetizálása során felhasznált vegyszereket (metanol, ecetsavanhidrid, hangyasav, dimetil-szulfát, diazometán) a Reanal és a Sigma-Aldrich gyártóktól szereztük be. Az NMR spektroszkópiához referenciaanyagként a 3-trimetilszilil-1-propánszulfonsav nátriumsóját (DSS  $\geq 99\%$ , Fluka) használtuk, a minták megfelelő térfogatszázalékban  $\geq 99,8$  atom% izotóptisztaságú  $\text{D}_2\text{O}$  oldószerrel (Aldrich) készültek. Az újonnan szintetizált vegyületek NMR-szerkezetigazolását  $\text{DMSO}-d_6$  (deuteráltság  $\geq 99,5$  atom%) (Aldrich) oldószerben végeztük. A megoszlási hányados mérésénél HPLC tisztaságú oktanolt használtunk, amely szintén a Sigma-Aldrich cég terméke volt. A titrálások oldószerként 18,2 MΩ cm fajlagos ellenállású Millipore vizet használtunk. A kereskedelem-ből beszerzett anyagokat tisztítás nélkül használtuk.

### Modellvegyületek előállítás

Mind a protonálódási mikroállandók, mind a részecske-specifikus lipofilitás meghatározásához szükségünk volt csökkentett számú protonálható csoporttal rendelkező származékokra. Az anyavegyületekből metil-észter [15], O-metil-éter [16, 17], és O-metil-karboximetil-észter [15, 16] származékokat szintetizáltunk a megadott irodalmi hivatkozások alapján. Az előállított termékek szerkezetigazolása 1D és 2D NMR, illetve nagyfelbontású, pontos tömeg adataik alapján történt.

### $^1\text{H}$ NMR titrálás

A méréseket inverz geometriájú 5 mm-es gradiens mérőfejjel rendelkező Varian Unity Inova 600 MHz-es NMR spektrométeren végeztük  $25 \pm 0,1^\circ\text{C}$ -on. Az NMR titrálások egységesen 5 mm-es



NMR csőben történtek, a kémiai eltolódásokat DSS belső referensre vonatkoztattuk. Az oldatok 5 v/v% D<sub>2</sub>O-t tartalmaztak, amely csak 0,02 egységgel változtatja meg a pH-skálát az üvegelektroddal történő mérések pontosságán belül, így korrekcióra nincs szükség [18]. A víz rezonanciajelének csökkentésére kettős spin echo (dpfge) pulzust alkalmaztunk [19]. A méréseket konstans 0,15 M ionerősség mellett végeztük, az ionerősség beállítására KCl-ot alkalmaztunk. A pH-mérésre pH 3-12,5 között kombinált üvegelektrodot használtunk. Savas közegben pH < 3 alatt, hogy kiküszöböljük az elektród hibáját, a pontos pH-t két *in situ* indikátormolekula, a diklórecetsav és a klórecetsav kémiai eltolódásaiból számítottuk ki az alábbi egyenletnek megfelelően:

$$pH = \log K_{ind} + \log \frac{\delta_{ind}^{mért} - \delta_{Hind}}{\delta_{ind} - \delta_{ind}^{mért}} \quad (3)$$

ahol  $K_{ind}$  az adott indikátormolekula protonálódási állandója ( $\log K = 1,14$  diklórecetsav és  $\log K = 2,27$  klórecetsav esetén),  $\delta_{Hind}$  és  $\delta_{ind}$  a deprotonált és a protonált forma kémiai határeltolódásai ( $\delta_{ind} = 6,050$ ,  $\delta_{Hind} = 6,345$  diklórecetsav esetén,  $\delta_{ind} = 4,049$ ,  $\delta_{Hind} = 4,280$  klórecetsav esetén),  $\delta_{ind}^{mért}$  az adott pH-n megfigyelt kémiai eltolódás.

A titrálásokhoz különböző pH-jú oldatokat készítettünk 0,15 M ionerősség mellett KCl, NaOH és HCl felhasználásával 1 mM indikátormolekula és 0,1 mM DSS tartalom mellett. A titrálások során a Tyr, MIT, DIT és ezen anyagok származékvegyületeiből 1,5 mM-os oldatokat használtunk és 8-16 tranziensből vettük fel a spektrumokat az egyes pH-kon. A pajzsmirigyhormonokból (rT3, T3, T4) és származékaikból a gyenge oldhatóság miatt csak 0,1 mM-os oldatokat tudtunk készíteni, lúgos pH tartományban 128-256 tranziens, míg savas pH-n több ezer tranziens kellett alkalmaznunk a jelek megfelelő detektálásához.

A könnyen bomló, lúgerzékeny metil-észterek esetén 0,14 M KCl felhasználásával egy alapoldatot készítettünk, amit 0,01/0,02 M HCl és NaOH oldattal titráltuk, így az ionerősség a vizsgálat során 0,16 M alatt maradt. A metil-észterek jelei pH 11-ig biztonságosan azonosíthatók voltak.

A protonálódási egyensúlyok makroszkopikus kiértékeléséhez az OPIUM és a Microcal OriginPro 8.0 programokat használtuk.

#### UV-pH titrálás

A Tyr, MIT és T3 fenolát  $k^o$  mikroállandójának

meghatározására UV-pH titrálást is alkalmaztunk. A titrálás során a színeképeket szobahőmérsékleten 0,5-1 nm lépésközzel vettük fel 200-400 nm-es tartományban 1 cm úthosszú kvarcküvetát használva egy Jasco V-550 típusú diódasoros spektrofotométeren. A Tyr-ból és a MIT-ből 0,2 mM koncentrációjú törzsoldatot, a T3-ből 2 nM-os törzsoldatot készítettünk, amely elegendő volt a meghatározáshoz a T3 magas moláris fajlagos abszorpciója miatt. A ligandumok hígulásának elkerülése végett a törzsoldatokat két egyforma térfogatú részletre osztottuk, és megfelelő, egyazon mennyiségű HCl-val és NaOH-dal kezeltük, létrehozva a savas illetve lúgos törzsoldatokat. A két oldat elegyítésével kalibrált elektród mellett különböző kémhatású oldatokat készítettünk, majd az oldatok UV-VIS spektrumát rögzítettük. Az oldatok ionerősségét ( $I = 0,15$  M) kálium-kloriddal állítottuk be. A kiértékelést azon a hullámhosszon végeztük, ahol az eltérő pH-jú oldatok spektrumán a legnagyobb abszorpciaváltozás volt megfigyelhető. Az UV-pH titrálás adatainak kiértékeléséhez Statistica 6.0 programot használtunk.

#### Megoszlási hányados meghatározása keverőedényes módszerrel

A vizsgált anyavegyületek és egyes származékaik oktanol/víz látszólagos megoszlási hányadosát keverőedényes módszerrel határoztuk meg a megoszlás előtti és utáni mért abszorbanciák felhasználásával, különböző fázisarányoknál. A megoszlási kísérlet előtt az oktanolos illetve vizes fázisokat egymással telítettük legalább 3 órán át tartó intenzív kevertetéssel 25 °C-on, majd legalább 24 órás szétválási idő után használtuk az egymással telített fázisokat. A meghatározáshoz szükséges különböző pH-jú oldatok elkészítéséhez citrát, foszfát, TRIS puffereket, illetve faktorozott sósavat és NaOH oldatokat használtunk, figyelembe véve, hogy adott pH-n adott puffernek minél nagyobb legyen a pufferkapacitása. Az ionerősség minden esetben 0,15 M volt. A gyenge oldhatóság miatt a pajzsmirigyhormonok esetén az oktanolos fázist, a MIT és a DIT esetén a vizes fázist használtuk fel a meghatározásokhoz. A pajzsmirigyhormonok abszorpció maximumának hullámhosszán az oktanol fényelnyelése elhanyagolható, így az oktanolos fázisból is pontos abszorbanciákat lehet mérni. A fázisarányt úgy választottuk meg, hogy analitikailag jól mérhető anyagmennyiség maradjon az egyes fázisokban a megoszlás után is. A megfelelő fázisok koncentrációcsökkenését UV spektrofoto-

metriás módszerrel követtük, a 250 és 400 nm közötti UV spektrumot regisztráltuk.

#### *In silico* receptorkötődés vizsgálat

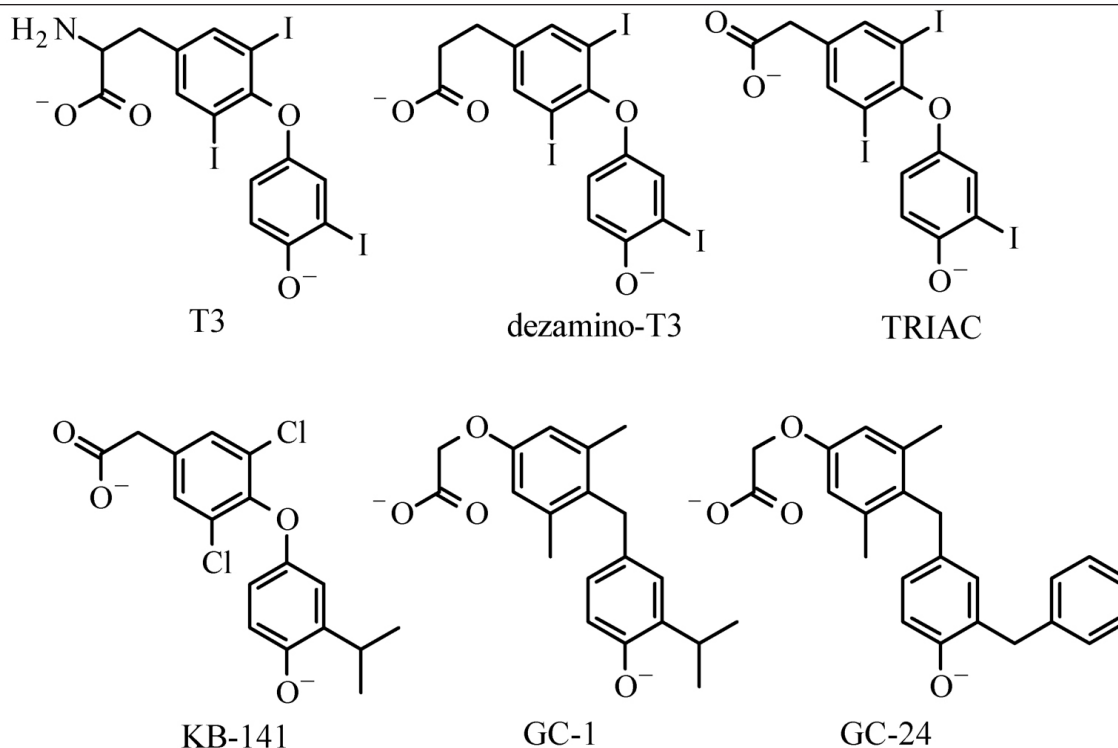
A számítógépes modellezés során a célunk a pajzsmirigyhormonok egyes mikrorészecskéinek flexibilis dokkolása volt a pajzsmirigyhormon receptor (TR) két izoformájához (TR $\alpha$  és TR $\beta$ ).

A pajzsmirigyhormon-receptor – ligand együtt kristályosított komplex szerkezeteket a Protein Data Bank adatbázisból ([www.pdb.org](http://www.pdb.org)) töltöttük le. Módszerünkhöz és annak validálásához az alábbi PDB ID-val rendelkező szerkezeteket használtuk: 2H77 (T3 – TR $\alpha$ ), 3HZF (GC-1 – TR $\alpha$ ), 3JZB (TRIAC – TR $\alpha$ ), 1NAV (KB-141 – TR $\alpha$ ), 3GWS (T3 –  $\beta$ ), 3IMY (GC-1 – TR $\beta$ ), 3JZC (TRIAC – TR $\beta$ ), 1NAX ((KB-141 – TR $\beta$ ), 1Q4X (GC-24 – TR $\beta$ ). A tireomimetikumok konstitúciós képlete a 2. ábrán látható. A dokkolások során használt fehérjék röntgenkristallográfiás felbontása minden esetben 2.8 Å-nél kisebb volt.

A szerkezetek geometriai optimalizálását és a dokkolásokat a Schrödinger molekulamodellező program különböző moduljaival végeztük el. Grafikus átalakítónak a Maestrot alkalmaztuk [20]. A fehérjeszerkezeteket a Protein Preparation Wizard alkalmazásával készítettük elő a kötőhely model-

lezéséhez. A letöltött röntgenkristallográfiás szerkezeteket a fiziológiás körülményeknek megfelelően (pH=7,4) egészítettük ki hidrogénnel. Emiatt az Arg és Lys oldalláncok minden esetben kationos, míg a karboxilátot tartalmazó Glu és Asp aminosavak anionos állapotban voltak. A fehérjeszerkezetben található felesleges vizeket (lone water) és egyéb ligandokat eltávolítottuk. A fehérjemolekulák esetében OPLS2005 erőteret használtunk a geometriai optimalizálás végrehajtásához. A fehérje megfelelő optimalizálása után a dokkolási doboz kijelölése történt meg, amelynek középpontját a fehérjében lévő ligand helyzete, míg nagyságát annak mérete befolyásolta. A ligandumok geometriai optimalizálását a Schrödinger program LigPrep moduljával végeztük MMFF94s erőteret alkalmazva. Az egyes protonáltsági mikrorészecskéket egyesével dokkoltuk a receptor-fehérjékhez a Glide modult használva. A dokkolásokat minden esetben flexibilisen végeztük XP (extra precíz), azaz nagyfelbontású mód használatával, azért, hogy minél pontosabb értékeket kapjunk [21]. A dokkolások kimeneteleként a legjobb három eredményt írtuk ki a Glide pontozási funkciójának megfelelően.

Módszerünk alkalmazhatóságának bizonyítására de Araujo és mtsai. által kidolgozott eljárást követtük kisebb változtatásokkal [22]. Hat olyan



2. ábra: Az *in silico* dokkolás során használt vegyületek konstitúciós képlete



I. táblázat

Az irodalomban megtalálható kísérletes ( $\Delta G_{\text{exp.}}$ ), valamint az *in silico* dokkolás ( $\Delta G_{\text{calc.}}$ ) során meghatározott kötődési szabadenergia értékek a pajzsmirigyhormon-receptor két izoformájához kcal/mol-ban megadva

ligand	$\Delta G_{\text{exp.}}$		$\Delta G_{\text{calc.}}$	
	TR $\alpha$	TR $\beta$	TR $\alpha$	TR $\beta$
T3	-12,9 [23]	-12,6 [24]	-12,11	-12,67
Dezamino-T3	-15,04 [22]	-15,22 [22]	-14,52	-14,59
TRIAC	-13,86 [22]	-14,04 [22]	-12,74	-11,99
KB-141	-11,08 [24]	-12,86 [24]	-10,87	-12,88
GC-1	-12,28 [22]	-13,70 [22]	-12,46	-13,29
GC-24	-10,73 [22]	-13,54 [22]	-10,96	-13,35

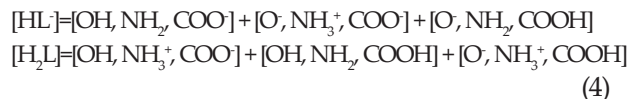
pajzsmirigyhormon agonistát (2. ábra) dokkolunk a receptor mindkét izoformájához, ahol a kísérletes kötődési szabadenergia ( $\Delta G$ ) értékek az irodalomban megtalálhatók, illetve a receptor-ligand komplexek röntgenkristallográfiás szerkezete adatbázisból letölthető. Az *in silico* dokkolással számított és a kísérletesen meghatározott kötődési szabadenergia értékeket korreláltattuk egymással. A lineáris korrelációs együttható dokkolási kísérletekhez képest magas értéke ( $r^2=0,7765$ ) illetve a két adatsor közti kis átlagos eltérés ( $\Delta=0,55$  kcal/mol) bizonyítja, hogy az általunk használt eljárás alkalmazható a pajzsmirigyhormon mikrorészecskéi és a receptorfehérje közötti kölcsönhatás vizsgálatára (I. táblázat, 3. ábra).

### Eredmények

A pajzsmirigyhormonok és előanyagaik három

báziscentrummal rendelkeznek, ezek a fenolát-, amino- és karboxilátcsoport. A 4. ábrán látható, hogy mint háromcsoportos molekulák a 4 protonáltsági makroállapot ( $L^2$ ,  $HL$ ,  $H_2L$ ,  $H_3L^+$ ) összesen 8 mikrorészecskével és 12 mikroállandóval jellemezhető.

A makro- és mikrorészecskék koncentrációja között az alábbi összefüggések állnak fenn:

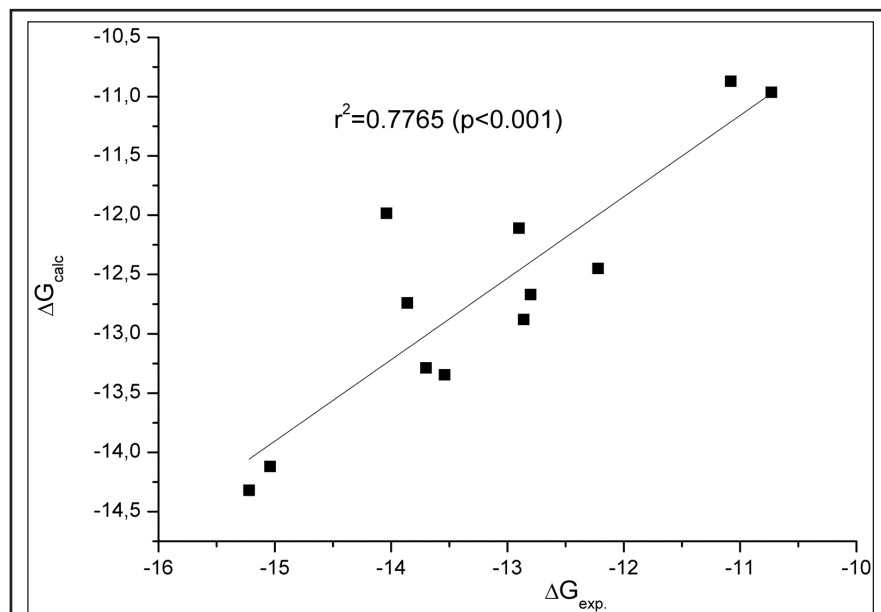


Mikrospeciáción a mikroszkopikus sav-bázis paraméterek és a mikrorészecskék relatív koncentrációjának a meghatározását értjük [1]. A lépcsőzetes  $k$  mikroállandók az adott funkciós csoport bázicitását jellemzik, a többi csoport meghatározott állapotában. A mikroszkopikus protonálódási állandók felső indexe jelöli az adott folyamatban protonálódó csoportot, az esetleges alsó index a már protonált csoportot.

A fenolátcsoport bázicitását például négy mikrorészecske ( $O^-, NH_2, COO^-$ ), ( $O^-, NH_3^+, COO^-$ ), ( $O^-, NH_2, COOH$ ), ( $O^-, NH_3^+, COOH$ ) protonálódása alapján definiáljuk a következőképpen:

$$k^O = \frac{[OH, NH_2, COO^-]}{[O^-, NH_2, COO^-][H^+]}$$

$$k_N^O = \frac{[OH, NH_3^+, COO^-]}{[O^-, NH_3^+, COO^-][H^+]}$$



3. ábra: A kísérletes és az általunk számított kötődési szabadenergia értékek korrelációja

$$k_C^O = \frac{[\text{OH}, \text{NH}_2, \text{COOH}]}{[\text{O}^-, \text{NH}_2, \text{COOH}][\text{H}^+]};$$

$$k_{\text{NC}}^O = \frac{[\text{OH}, \text{NH}_3^+, \text{COOH}]}{[\text{O}^-, \text{NH}_3^+, \text{COOH}][\text{H}^+]} \quad (5)$$

A makro- és mikroállandók közti összefüggések az alábbi egyenletekkel írhatók le:

$$K_1 = k^O + k^N + k^C \quad (6)$$

$$K_1 K_2 = k^O k_O^N + k^O k_O^C + k^N k_N^C = k^O k_O^N + k^C k_C^O + k^C k_C^N = \dots \quad (7)$$

$$K_1 K_2 K_3 = k^O k_O^N k_{\text{NO}}^C = k^C k_C^N k_{\text{CN}}^O = \dots \quad (8)$$

A mikroállandókból származtatott paraméter a kölcsönhatási tényező ( $E$ ). A többcsoportos molekulákban a kölcsönhatási tényező azt számszerűsíti, hogy az egyik csoport protonálódása milyen mértékben csökkenti a másik csoport bázicitását. A kölcsönhatási tényező illetve annak logaritmusa az amino- és a karboxilátcsoport példáján az alábbi módon számolható:

$$E^{\text{NC}} = \frac{k^N}{k_C^N} = \frac{k^C}{k_N^C} \quad (9)$$

$$\log E^{\text{NC}} = \log k^N - \log k_C^N = \log k^C - k_N^C \quad (10)$$

#### Protonálódási makroállandók meghatározása

Az  $^1\text{H}$  NMR-pH titrálások során a vizsgált vegyületek valamennyi megfigyelhető szénkötésű protonjának pH –  $\delta^{\text{mért}}$  adatsorára az alábbi egyenlet segítségével, az állandókat egyidejűleg illesztve határoztuk meg a lépcsőzetes protonálódási állandókat:

$$\delta^{\text{mért.}} = \delta_{\text{L}^{2-}} \chi_{\text{L}^{2-}} + \delta_{\text{HL}^-} \chi_{\text{HL}^-} + \delta_{\text{H}_2\text{L}} \chi_{\text{H}_2\text{L}} + \delta_{\text{H}_3\text{L}^+} \chi_{\text{H}_3\text{L}^+} =$$

$$= \frac{\delta_{\text{L}^{2-}} + \delta_{\text{HL}^-} K_1[\text{H}^+] + \delta_{\text{H}_2\text{L}} K_1 K_2 [\text{H}]^2 + \delta_{\text{H}_3\text{L}^+} K_1 K_2 K_3 [\text{H}]^3}{1 + K_1[\text{H}^+] + K_1 K_2 [\text{H}]^2 + K_1 K_2 K_3 [\text{H}]^3} \quad (11)$$

ahol  $\delta_{\text{L}^{2-}}$ ,  $\delta_{\text{HL}^-}$ ,  $\delta_{\text{H}_2\text{L}}$ ,  $\delta_{\text{H}_3\text{L}^+}$  az egyes makroszkopikus protonáltsági állapotokhoz tartozó kémiai eltolódásokat,  $\chi_{\text{L}^{2-}}$ ,  $\chi_{\text{HL}^-}$ ,  $\chi_{\text{H}_2\text{L}}$ ,  $\chi_{\text{H}_3\text{L}^+}$  az ezen állapotban lévő részecskék móltörtjét jelöli.

Az anyavegyületek protonálódási állandóit a **II. táblázatban**, míg a csökkentett számú protonálható csoporttal rendelkező vegyületek

protonálódási állandóit a **III. táblázatban** foglaltuk össze.

A lépcsőzetes protonálódási állandók értékei azt mutatják, hogy a karboxilátcsoport protonálódási pH tartománya gyakorlatilag elkülönül a másik két csoportétól, amint ez az anyavegyületek  $\log K_3$  illetve az *O*-metil-származékok  $\log K_2$  értékeiből látszik. A DIT mindhárom makroállandója közti különbség több mint 3  $\log K$  egység, míg a T4 és az rT3 esetén a makroállandók közti eltérés legalább 2  $\log K$  egység, vagyis e molekuláknál mindhárom csoport protonfelvétele elkülönül. A jódatom(ok) beépülése az egész molekula bázicitását csökkenti, ami legjobban a  $\log K_2$  értékében fejeződik ki.

A pajzsmirigyhormonok dimetil-származékainak protonálódási állandóit a gyenge oldhatóság miatt nem tudtuk meghatározni, míg az *O*-metil-liotironin protonálódási makroállandóinak ismerete nem szükséges a T3 további mikroállandóinak számításához, mivel az UV-pH titrálással meghatározott  $\log k^O$  mikroállandó és az amino-karboxilát kölcsönhatási tényező ismerete elegendő a T3 teljes mikrospeciációjához.

#### Protonálódási mikroállandók meghatározása UV-pH titrálással

A protonálódási mikroállandók meghatározhatók UV-pH titrálással, ha a megfelelő mikrorészecskék koncentrációja összemérhető, illetve ha található olyan hullámhossz, ahol az egyik csoport protonfelvételéhez köthető abszorbanciaváltozás szelektíven követhető. A fenolátra jellemző mikroállandók általában meghatározhatók ily módon, mert 300 nm körül az UV-spektrum pH függése szelektíven a fenolát csoporthoz rendelhető. Ezt az állítást támasztja alá az UV-pH titrálási görbéken 265 és 285 nm hullámhosszak közelében megjelenő izobesztikus (izoabszorbanciás) pontok is.

A vizsgált vegyületeink közül a  $k^O$  értéke UV-pH titrálással a Tyr, MIT és T3 esetén határozható meg, mivel a többi molekulában az amino és a fenolát bázicitás nem összemérhető.

A meghatározáskor figyelembe vettük, hogy a karboxilát protonálódási állapota pH 5 felett nem változik, így ebben a pH tartományban a vegyületek kétcsoportos molekulaként kezelhetők. A mikroállandókat a mérési adatpontokból az alábbi összefüggések segítségével számoltuk, felhasználva az NMR-pH titrálások során meghatározott  $K_1$  és  $K_2$  makroállandók értékeit:

$$\alpha_{\text{OH(pH)}} = \frac{A_{\text{O}^-} - A_{\text{pH}}}{A_{\text{O}^-} - A_{\text{OH}}} \quad (12)$$

## II. táblázat

Pajzsmirigyhormonok és előanyagaik protonálódási makroállandói ( $T=25\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $I=0,15\text{ M}$ ) [25].

	Tyr	MIT	DIT	T4	T3	rT3
$\log K_1$	$10,17 \pm 0,02$	$9,63 \pm 0,01$	$9,41 \pm 0,01$	$8,60 \pm 0,03$	$8,87 \pm 0,05$	$9,01 \pm 0,03$
$\log K_2$	$9,06 \pm 0,03$	$8,12 \pm 0,01$	$6,23 \pm 0,02$	$6,59 \pm 0,03$	$8,20 \pm 0,05$	$6,71 \pm 0,03$
$\log K_3$	$2,27 \pm 0,03$	$2,16 \pm 0,01$	$2,07 \pm 0,02$	$2,01 \pm 0,06$	$2,03 \pm 0,03$	$2,04 \pm 0,03$

## III. táblázat

Az O-metil-, karboximetil- és dimetil-származékok protonálódási makroállandói ( $T=25\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $I=0,15\text{ M}$ ) [25].

		Tyr	MIT	DIT	T3	T4	rT3
O-metil	$\log K_1$	$9,21 \pm 0,01$	$9,01 \pm 0,01$	$8,79 \pm 0,01$	-	$8,55 \pm 0,02$	$8,80 \pm 0,02$
	$\log K_2$	$2,25 \pm 0,02$	$2,19 \pm 0,02$	$2,07 \pm 0,04$	-	$2,05 \pm 0,05$	$2,07 \pm 0,05$
C-metil	$\log K_1$	$9,78 \pm 0,01$	$8,47 \pm 0,02$	$7,46 \pm 0,04$	$8,42 \pm 0,03$	$6,90 \pm 0,03$	$7,09 \pm 0,04$
	$\log K_2$	$7,17 \pm 0,01$	$6,95 \pm 0,02$	$5,87 \pm 0,04$	$6,63 \pm 0,04$	$6,25 \pm 0,03$	$6,43 \pm 0,02$
dimetil	$\log K$	$7,19 \pm 0,01$	$7,00 \pm 0,02$	$6,79 \pm 0,03$	-	-	

$$k^O = \frac{\alpha_{OH(pH)}(1 + K_1[H^+] + K_1K_2[H^+]^2) - K_1K_2[H^+]^2}{[H^+]}$$

(13)

$$K_1 = k^O + k^N$$

(14)

$$K_1 K_2 = k^O k^N_{CO} = k^N k^O_{CO}$$

(15)

ahol  $\alpha_{OH(pH)}$  a fenolátcsoporton protonált részecskék móltörtje adott pH-n,  $A_{pH}$  az adott pH-n és hullámhosszon mért abszorbancia,  $\alpha_{OH}$  és  $A_{O^-}$  pedig a csoport teljes protonáltsága illetve deprotonáltsága esetén mért abszorbancia érték.

A kísérletileg meghatározott  $k^O$  illetve a (14)-(15) egyenlet segítségével számolt  $k^N$ ,  $k^N_{CO}$  és  $k^O_{CO}$  mikroállandók, illetve az  $E^{ON}$  kölcsönhatási tényező értékeit a IV. táblázat tartalmazza.

## A vizsgált vegyületek teljes mikrospeciációja

A vizsgált hat vegyület egyenként 12 mikroállandójának meghatározásához a következő adatokat használtuk fel:

– a kérdéses vegyület makroállandói

– a csökkentett számú protonálható csoporttal rendelkező származék vegyület(ek) makroállandói

– az UV-pH titrálás során meghatározott mikroállandók

– az amino és a karboxilát csoport közötti kölcsönhatási tényező.

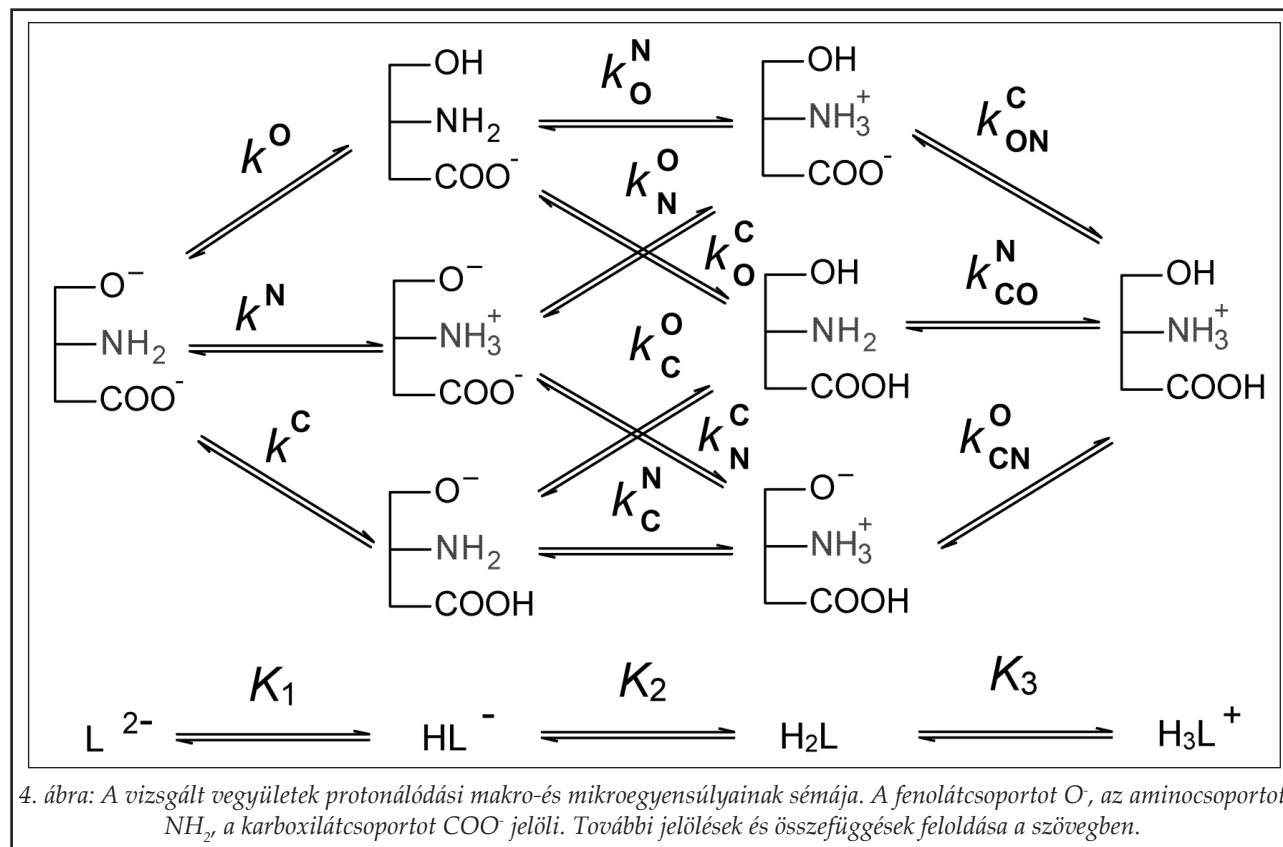
Összhangban a vegyületeink protonálódási sémájával (4. ábra) és felhasználva a (6) – (8) egyenleteket, a mikroállandók meghatározhatók az alábbi metodikát követve:

1.  $\log K_3 = \log k^C_{NO}$ , mivel a  $k^C_{NO}$  útvonalon történő protonálódás sokkal jelentősebb, mint a  $k^O_{NC}$  és  $k^N_{CO}$  útvonal szerinti.
2.  $k^N_{CO}$  értéke megegyezik a dimetil-származékok protonálódási makroállandójával.
3.  $k^N_{CO}$  és  $k^O_{CO}$  értéke meghatározható az O-metil-éter származékok makroállandóiból felhasználva  $k^N_{CO}$  értékét
3. 4.  $k^O_{CO}$  értéke meghatározható a karboximetil-származékok makroállandóiból felhasználva  $k^N_{CO}$  értékét.
4.  $k^O$  és  $k^C$  értéke számítható a 8. egyenletből.
5.  $k^N$  értéke a 6. egyenlet segítségével számítható.
6. A többi mikroállandó értéke megkapható a 8. és 10. egyenlet felhasználásával.

## IV. táblázat

Az UV - pH titrálás során meghatározott mikroállandók [25].

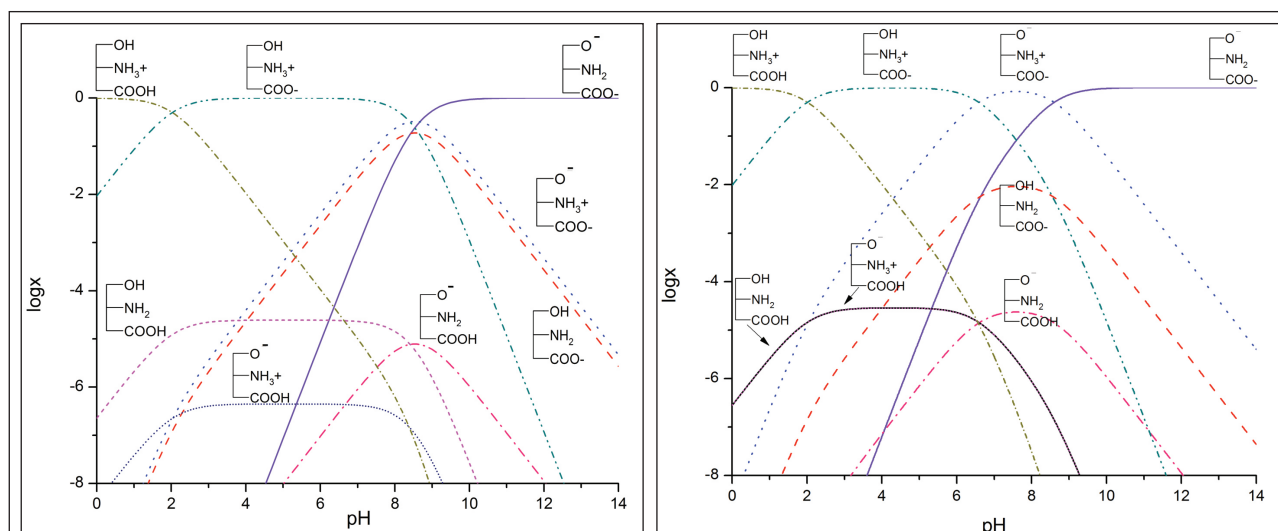
	Tyr	MIT	T3
$\log k^O$	$10,03 \pm 0,01$	$8,72 \pm 0,03$	$8,43 \pm 0,02$
$\log k^N$	9,61	9,57	8,67
$\log k^O_{CO}$	9,62	8,18	8,40
$\log k^N_{CO}$	9,20	9,03	8,64
$\log E^{ON}$	0,41	0,54	0,03



A T4 és a rT3 esetében a dimetil-származékok protonálódási makroállandóit – mint már említettük – a csekély vízdoldékonyság miatt nem tudtuk meghatározni. Ebben az esetben  $k_{C,O}^N$  értékét a DIT-ban meghatározott amino-karboxilát kölcsönhatási tényező felhasználásával kaptuk meg, mivel a kölcsönhatási tényező értékének átvitele rokon szerkezetű molekulák esetén nem okoz érdemi hibát a mikroállandók meghatározásában [9].

A T3 esetén négy mikroállandó értékét ( $k^O$ ,  $k^N$ ,  $k_{N,O}^O$ ,  $k_{O,N}^C$ ) UV-pH titrálással határoztuk meg, míg a többi mikroállandót a karboximetil-T3 két makroállandójának és a DIT amino-karboxilát kölcsönhatási tényezőjének felhasználásával határoztuk meg.

A protonálódási mikroállandók értékeit illetve az egyes csoportok közti kölcsönhatási tényezőket a vizsgált molekulák esetén az **V. táblázat** tartalmazza.



5. ábra: T3 (balra) és T4 (jobbra) mikrorészecskéinek eloszlás diagramja

V. táblázat

Vizsgált vegyületeink funkciós csoportok szerint rendszerezett protonálódási mikroállandói, valamint a kölcsönhatási tényezők [25].

		Tyr	MIT	DIT	T3	T4	rT3
Fenolát mikroállandók							
	$\log k^O$	10,04	8,71	6,85	8,43	6,64	6,76
	$\log k_N^O$	9,65	8,18	6,23	8,40	6,59	6,71
	$\log k_C^O$	9,76	8,42	6,54	8,41	6,60	6,72
	$\log k_{CN}^O$	9,37	7,89	5,92	8,38	6,55	6,67
Amino mikroállandók							
	$\log k^N$	9,58	9,57	9,41	8,67	8,60	8,85
	$\log k_O^N$	9,19	9,04	8,79	8,64	8,55	8,80
	$\log k_C^N$	7,58	7,53	7,41	6,67	6,60	6,85
	$\log k_{OC}^N$	7,19	7,00	6,79	6,64	6,55	6,80
Karboxilát mikroállandók							
	$\log k^C$	4,55	4,49	4,37	4,05	4,05	4,07
	$\log k_O^C$	4,27	4,20	4,06	4,03	4,01	4,03
	$\log k_N^C$	2,55	2,45	2,37	2,05	2,05	2,07
	$\log k_{NO}^C$	2,27	2,16	2,06	2,03	2,01	2,03
Kölcsönhatási tényezők							
	$\log E^{ON}$	0,39	0,53	0,62	0,03	0,05	0,05
	$\log E^{NC}$	2,00	2,04	2,00	2,00	2,00	2,00
	$\log E^{OC}$	0,28	0,29	0,31	0,02	0,04	0,04

Összehasonlítva az UV-pH titrálással és a deduktív módszerrel kapott mikroállandók értékeit (IV. és V. táblázat) Tyr és MIT esetén, azt látjuk, hogy az értékek jó egyezést mutatnak, a különbség az egyes mikroállandók között mindenhol kisebb, mint 0,05 logk egység.

Az V. táblázat értékeiből látszik, hogy a jód atom minden protonálható csoport bázicitását csökkenti, köztük kiemelkedő mértékben a fenolátét. A második jód atom beépülésével a bázicitás-csökkentő hatás még kifejezettebb. A MIT  $\log k^O$  értéke 1,33-dal kisebb a Tyr-hoz képest, míg a DIT esetén a második jód atom beépülése 1,86-dal csökkenti tovább a fenolát bázicitását.

Másodlagos hatásként megfigyelhető, hogy a kölcsönhatási tényező értéke az amino- és a fenolátcsoport között egyre nő, mivel a jód atom beépülésével az elektronsűrűség az aromás gyű-

rűben nagyobb mértékben csökken, mint az alifás láncon. Az amino és karboxilát közötti kölcsönhatási tényező értéke 2,00 – 2,04, amely jó egyezést mutat az aminosavaknál megfigyelhető kölcsönhatási tényező értékével [26].

A protonálódási mikroállandók értékeit felhasználva megszerkeszthetők a vegyületek pH-függő részecske-eloszlás függvényei, amikről leolvasható, hogy a szervezet egyes kompartmentjeiben melyik mikrorészecske mekkora valószínűséggel fordul elő. A T3 és T4 pH-függő részecskeeloszlás diagramjai az 5. ábrán látható.

Az eloszlás diagramokon látható, hogy pH 2 alatt minden molekula esetében a teljesen protonált forma (OH, NH<sub>3</sub><sup>+</sup>, COOH) nagyságrendekkel uralodik, míg pH 10,5 felett a teljesen deprotonált forma (O<sup>-</sup>, NH<sub>2</sub>, COO<sup>-</sup>) dominál. A köztes pH értékeknél jelentős különbségek figyelhetők meg az



VI. táblázat

Számított kötődési szabadenergia értékek a három pajzsmirigyhormon összes mikrorészecskéjére kcal/mol egységben [33].

A kisebb kötődési érték (= nagyobb negatív kcal/mol adat) erősebb kötődést jelent a receptorhoz.

	T3 (TR $\alpha$ )	T3 (TR $\beta$ )	T4 (TR $\alpha$ )	T4 (TR $\beta$ )	rT3 (TR $\alpha$ )	rT3 (TR $\beta$ )
NH <sub>2</sub> , COO <sup>-</sup> , O <sup>-</sup>	-12,11	-12,69	-11,15	-10,44	-7,05	-7,62
NH <sub>3</sub> <sup>+</sup> , COO <sup>-</sup> , O <sup>-</sup>	-9,46	-10,65	-8,69	-9,29	-5,17	-6,41
NH <sub>2</sub> , COOH, O <sup>-</sup>	-9,30	-8,47	-8,45	-9,34	-5,87	-6,01
NH <sub>3</sub> <sup>+</sup> , COOH, O <sup>-</sup>	-4,83	-6,35	-4,31	-6,80	-3,89	-5,74
NH <sub>3</sub> <sup>+</sup> , COO <sup>-</sup> , OH	-11,70	-11,70	-10,40	-9,71	-8,44	-8,58
NH <sub>2</sub> , COO <sup>-</sup> , OH	-13,18	-11,75	-12,15	-11,07	-9,51	-9,73
NH <sub>2</sub> , COOH, OH	-9,96	-10,13	-9,53	-9,76	-7,13	-8,21
NH <sub>3</sub> <sup>+</sup> , COOH, OH	-5,30	-6,86	-5,75	-6,98	-5,12	-6,49

egyes mikrorészecskék eloszlásában a különböző vegyületekben, elsősorban a fenolát csoport eltérő bázicitása miatt. A MIT és T3 esetén, ahol csak egy jód található a fenolos hidroxil közelében, a fenoláton protonált, ikerionos forma (OH, NH<sub>3</sub><sup>+</sup>, COO<sup>-</sup>) széles pH tartományban (2 < pH < 8) dominál. A DIT, T4, rT3 esetében ez a pH tartomány közel másfél pH egységgel szűkebb (2 < pH < 6,5). Az utóbbi vegyületeknél a vér pH-ján egy anionos forma (O<sup>-</sup>, NH<sub>3</sub><sup>+</sup>, COO<sup>-</sup>) fordul elő legnagyobb koncentrációban. Megfigyelhetjük továbbá, hogy a T3 és a MIT esetén a két anionos mikrorészecske ((O<sup>-</sup>, NH<sub>3</sub><sup>+</sup>, COO<sup>-</sup>) vs. (OH, NH<sub>2</sub>, COO<sup>-</sup>)) koncentrációjának az aránya összemérhető a fenolát és az amino csoport hasonló bázicitása miatt. Ezek a különbségek az egyes vegyületek mikrorészecskéinek eloszlásában hozzájárulhatnak a vegyületek eltérő biológiai szerepéhez is.

Az általunk meghatározott fenolát mikroállandók azt mutatják, hogy a DIT-ban a fenolát 93%-ban anionos formában fordul elő a vér pH-ján, míg ez az érték a MIT esetén csak 14%. A pajzsmirigyhormonok bioszintézise egy enzim katalizálta, komplex folyamat, ismert azonban az is, hogy a bioszintézishez a prekursor fenolátjának anionos formája szükséges [27]. Az általunk meghatározott fenolát mikroállandók alapján a pajzsmirigyben a szintetizálódó hormonnak közel 90%-ban a két DIT összekapcsolódásával képződő T4-nek kell lennie, ami jó összhangban áll élettani adatokkal [28].

Az általunk meghatározott mikrospeciációs adatokkal a vegyületek egyes fehérjékhez való affinitása is jobban értelmezhetővé válik. Biokémiai vizsgálatok szerint mind a transzportfehérjékhez, mind a receptorfehérjékhez való kötődés pH-függő folyamat, amelyet a pajzsmirigyhormonok egyes csoportjainak ionizációs állapota is befolyásol [29-31]. A vérben lévő transzportfehérjékhez

való kötődést a jód atomok száma, pozíciója és a fenolát csoport ionizációs állapota befolyásolja elsődlegesen [32]. Mindegyik szállítófehérjéhez (tiroxin-kötő fehérje (TBG), transztiretin (TTR), humán szérum albumin (HSA)) a T4 nagyobb affinitással kötődik, mint a T3 [33], amelynek egyik oka, hogy a T4 fenolos OH-ja a vér pH értékén nagyobbra deprotonált formában (O<sup>-</sup>) van jelen.

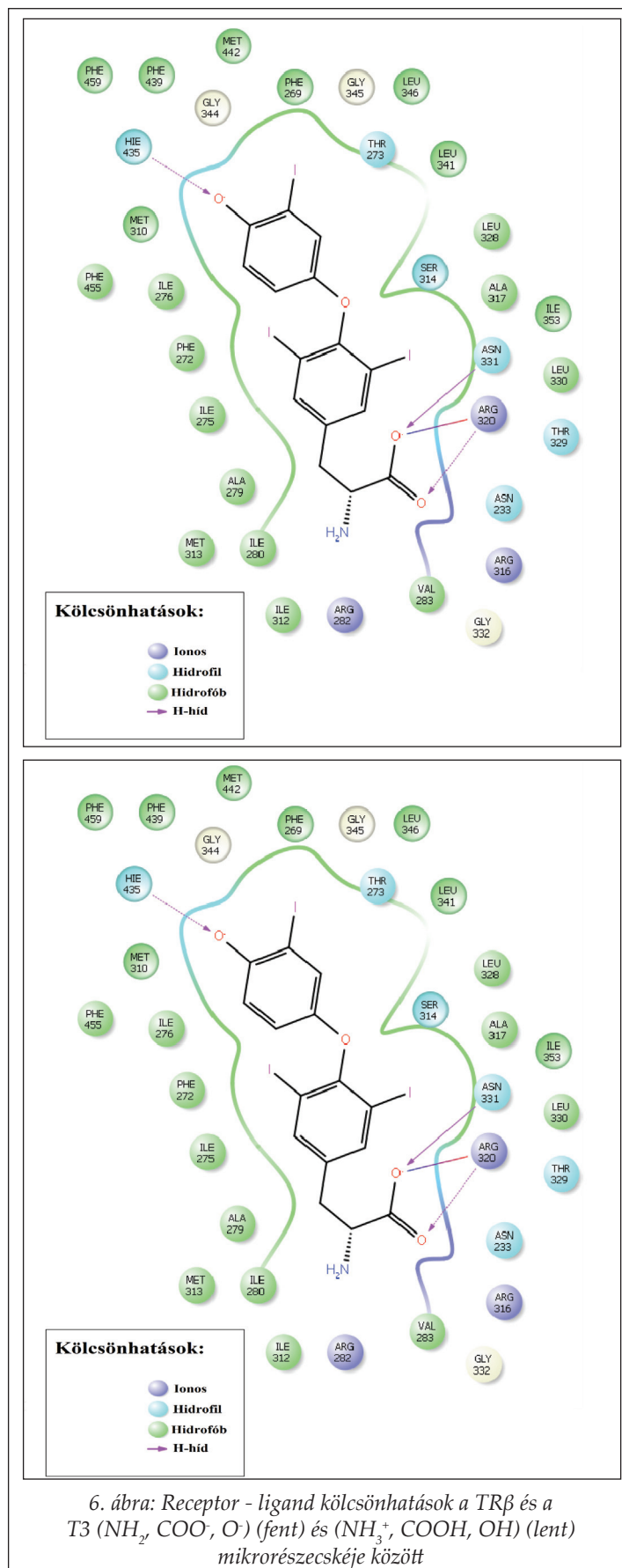
A pajzsmirigyhormonok szerkezet-hatás összefüggéseiből tudjuk, hogy a fenolos -OH csoport központi szerepet játszik a receptorhoz való kötődésben, illetve, hogy azok a származékok, amelyek nem tartalmaznak aminocsoportot, erősebben kötődnek a receptorhoz [29, 30]. Az egyes funkciós csoportok protonáltsági állapotának szerepét a receptorkötődésben molekulamodellezési kísérlettel tisztáztuk. A számítógépes modellezési kísérletek eredményeit és a belőlük levonható következtetéseket a következő fejezet részletezi.

#### *Pajzsmirigyhormonok mikrorészecskéinek in silico receptorkötődés vizsgálata*

A három vizsgált pajzsmirigyhormon (T3, T4, rT3) mikrorészecskéjét a két ismert pajzsmirigyhormon receptor izoformához (TR $\alpha$  és TR $\beta$ ) dokkoltuk. A dokkolás során a kapott kötési szabadenergia értékeket a VI. táblázat foglalja össze.

A táblázat adataiból látszik, hogy a T3 affinitása mindkét receptor izoformához a legnagyobb, míg legkisebb az rT3-é, ami egybevág fiziológiás receptorkötődési adatokkal: a T3 az aktív hormon, ez a vegyület kötődik jobban a receptorhoz, és vált ki biológiai hatást, míg a T4 a T3 prekursorának tekinthető [28].

A kötődési szabadenergia értékeket vizsgálva kitűnik, hogy a receptorhoz kötődés erősségét legjobban a molekulák aminosav részének ionizációs ál-



lapota befolyásolja: azoknál a mikrorészecskénél, ahol az amino- és a karboxilátcsoport is protonált formában van, a legrosszabbak a kötődési értékek, míg a legjobbak azok, ahol ezen csoportok deprotonált állapotúak. Az értékekből az is látszik, hogy a fenolátcsoport protonáltsági állapota kevésbé befolyásolja a receptoraffinitást. A 6. ábrán látható a T3 két mikrorészecskéjének dokkolása ( $(\text{NH}_2, \text{COO}^-)$  és  $(\text{NH}_3^+, \text{COOH}, \text{OH})$ ) a TR $\beta$  receptorhoz.

Az ábrán látható, hogy számos hidrofób aminosav található a receptor kötőzsebében, amelyek a jódtartalmú aromás gyűrűvel alakítanak ki kölcsönhatást. Ezen kívül két poláris régió található a kötőzsebben, az egyik egy hisztidin aminosav, ami hidrogénhidat képez a T3 fenolos OH-jával, a másik – három argininből és egy aszparaginból (Asn331) a TR $\beta$  esetén illetve három argininből és egy szerinből (Ser227) álló régió a TR $\alpha$  esetén – ami a flexibilis aminosav résszel képes erős másodlagos kölcsönhatásokat kialakítani. Az aminosav rész protonálódásának hatására ez utóbbi kölcsönhatások változnak meg kedvezőtlenül. Az aminocsoport protonfelvételével az arginin guanidinium csoportok és a hormon protonált amino (azaz ammónium) csoportjai között tasztító kölcsönhatás lép fel, amely azt eredményezi, hogy a másodlagos kötőerők nem tudnak kialakulni, továbbá a molekula elhelyezkedése a kötőzsebben is kedvezőtlenül változik. Ezek a hatások együttesen okozzák, hogy a kötési értékek azoknál a mikrorészecskénél a legjobbak, melyeknél az aminocsoport és a karboxilátcsoport deprotonált állapotban van. Ezek a megfigyelések összhangban állnak bizonyos kísérletileg meghatározott receptoraffinitási adatokkal, miszerint az aminocsoport a receptorkötődést csökkenti, ellenben fontos szerepet játszik a membránon keresztüli transzportban és a vegyületek metabolizmusában [28].

A fenolátcsoport protonfelvétele kevésbé befolyásolja a fehérjéhez kötődés erősségét, mivel a hisztidin és a fenolát között kialakuló hidrogénhid kialakulását a fenolátcsoport ionizáltsági állapota nem befolyásolja, viszont az aromás gyűrűrendszer elektronsűrűségét igen, ami magyarázza a különböző kötődési energiákat.

## VII. táblázat

A vizsgált vegyületek logD értéke oktanol/víz rendszerben [35, 36].

A pH(a), pH(b), pH(c) értékeket a kérdéses vegyület sav-bázis tulajdonságainak megfelelően választottuk.

Az értékek az egyes vegyületek esetén az alábbiak: pH (a) 4,31 (T4); 5,10 (T3); 4,40 (rT3); 4,15 (DIT); 5,15 (MIT); pH (b) 6,75 (T4); 7,55 (T3); 6,75 (rT3); 6,65 (DIT); 7,70 (MIT). pH (c) 7,61 (T4); 8,50 (T3); 7,80 (rT3); 7,80 (DIT); 8,88 (MIT).

Vegyület	pH 0,82	pH (a)	pH (b)	pH (c)	pH 13,18
T4	3,04 (0,02)	2,60 (0,02)	-	2,28 (0,03)	-1,89 (0,03)
karboximetil-T4	3,05 (0,05)	-	2,99 (0,06)	-	-
O-metil-T4	3,25 (0,06)	-	-	-	2,47 (0,05)
T3	2,06 (0,03)	2,24 (0,02)	-	1,77 (0,03)	- 2,70 (0,10)
karboximetil-T3	2,14 (0,04)	-	2,60 (0,04)	-	-
O-metil-T3	2,39 (0,02)	-	-	-	1,97 (0,03)
rT3	2,18 (0,02)	2,39 (0,02)	-	1,52 (0,03)	-2,58 (0,06)
karboximetil-rT3	2,27 (0,03)	-	2,75 (0,03)	-	-
O-metil-rT3	2,52 (0,03)	-	-	-	2,20 (0,04)
DIT	-0,51 (0,02)	-0,05 (0,03)	-	-1,18 (0,02)	<-4,5
karboximetil-DIT	-0,28 (0,02)	-	0,95 (0,03)	-	-
O-metil-DIT	-0,06 (0,04)	-	-	-	-0,53 (0,04)
MIT	-1,37 (0,05)	-0,79 (0,02)	-	-1,59 (0,05)	<-5
karboximetil-MIT	-1,12 (0,03)	-	0,26 (0,02)	-	-
O-metil-MIT	-0,90 (0,04)	-	-	-	-1,25 (0,04)

*Pajzsmirigyhormonok és előanyagaik  
részecske-specifikus lipofilitása*

Az egyes mikrorészecskék lipofilitásának meghatározáshoz először kiválasztottuk azokat a mikrorészecskéket, amelyek szignifikánsan hozzájárulnak a molekulák makroszkopikus lipofilitásához. Az egyszerűen protonált ( $O^-$ ,  $NH_2$ ,  $COOH$ ) forma minden molekulában figyelmen kívül hagyható a nagyon alacsony előfordulási aránya miatt. A kétszeresen protonált ( $O^-$ ,  $NH_3^+$ ,  $COOH$ ) forma relatív koncentrációja minden molekulában kisebb, vagy egyenlő, mint a várhatóan nagyobb lipofilitással rendelkező töltésmentes ( $OH$ ,  $NH_2$ ,  $COOH$ ) mikrorészecskéé. Így megállapíthatjuk, hogy hat mikrorészecske járul hozzá jelentősebb mértékben a molekula bruttó lipofilitásához.

A részecske-specifikus lipofilitás meghatározásához a kutatócsoportunkban kidolgozott módszert alkalmaztuk [12], bizonyos mikrorészecskék lipofilitásának meghatározásához származékvegyületek megoszlási adatait használtunk fel. A töltésmentes, semleges formát ( $OH$ ,  $NH_2$ ,  $COOH$ ) metil-észterrel, míg a ( $OH$ ,  $NH_2$ ,  $COO^-$ ) részecskét O-metil-éterrel modelleztük. Egy metilcsoport beépítése, azaz egy hidrogén metilcsoporttal való helyettesítése azonban nyilvánvalóan megváltoztatja (gyakorlatilag megnöveli) a molekula lipofilitását, amit korrekciós faktor bevezetésével minimalizálni kell. A korrekciós faktort a metilezett

származék és az anyavegyület erősen savas közegben ( $pH \approx 1$ ) meghatározott látszólagos megoszlási hányadosainak különbségéből számítottuk. Ezen a pH-n ugyanis az összes vizsgált molekula (valamennyi anyavegyület és azok valamennyi származéka) egységesen kationos állapotban fordul elő. A VII. táblázat tartalmazza a részecske-specifikus lipofilitás meghatározásához szükséges logD értékeket.

Erősen savas pH-n ( $pH \approx 1$ ) az anyavegyületek mért logD értékei gyakorlatilag azonosak a kationos ( $OH$ ,  $NH_3^+$ ,  $COOH$ ) mikrorészecskék megoszlási hányadosával. A származékvegyületek logD értéke ezen a pH-n a korrekciós faktor kinyeréséhez szükséges. Erősen lúgos pH-n ( $pH \approx 13$ ) az anyavegyületekre mért logD értékek a kétszeresen negatív töltésű részecske ( $O^-$ ,  $NH_2$ ,  $COO^-$ ) lipofilitását adják meg, mivel a többi részecske előfordulása ezen a pH-n elhanyagolható. Lúgos pH-n az O-metil-származékok logD értékéből a korrekciós faktort kivonva kapjuk a fenoláton protonált, egyszerűen negatív töltésű ( $OH$ ,  $NH_2$ ,  $COO^-$ ) részecske logp értékét. A karboximetil-észterek izoelektromos pontján ( $pH$  (b) a VII. táblázatban) mért logD értékből kivonva a korrekciós faktort kapjuk a semleges, töltéssel nem rendelkező részecske ( $OH$ ,  $NH_2$ ,  $COOH$ ) megoszlási hányadosát. Az ikerionos ( $OH$ ,  $NH_3^+$ ,  $COO^-$ ) és az anionos forma ( $O^-$ ,  $NH_3^+$ ,  $COO^-$ ) lipofilitása a (16) és (17) egyenlet segítségével számítható:

$$p^{(OH,NH_3^+,COO^-)} = (D_{(pH)} - x_{(OH,NH_2,COOH)}p^{(OH,NH_2,COOH)} - x_{(OH,NH_3^+,COOH)}p^{(OH,NH_3^+,COOH)})/x_{(OH,NH_3^+,COO^-)} \quad (16)$$

$$p^{(O^-,NH_3^+,COO^-)} = (D_{(pH)} - x_{(OH,NH_3^+,COO^-)}p^{(OH,NH_3^+,COO^-)} - x_{(OH,NH_2,COO^-)}p^{(OH,NH_2,COO^-)})/x_{(O^-,NH_3^+,COO^-)} \quad (17)$$

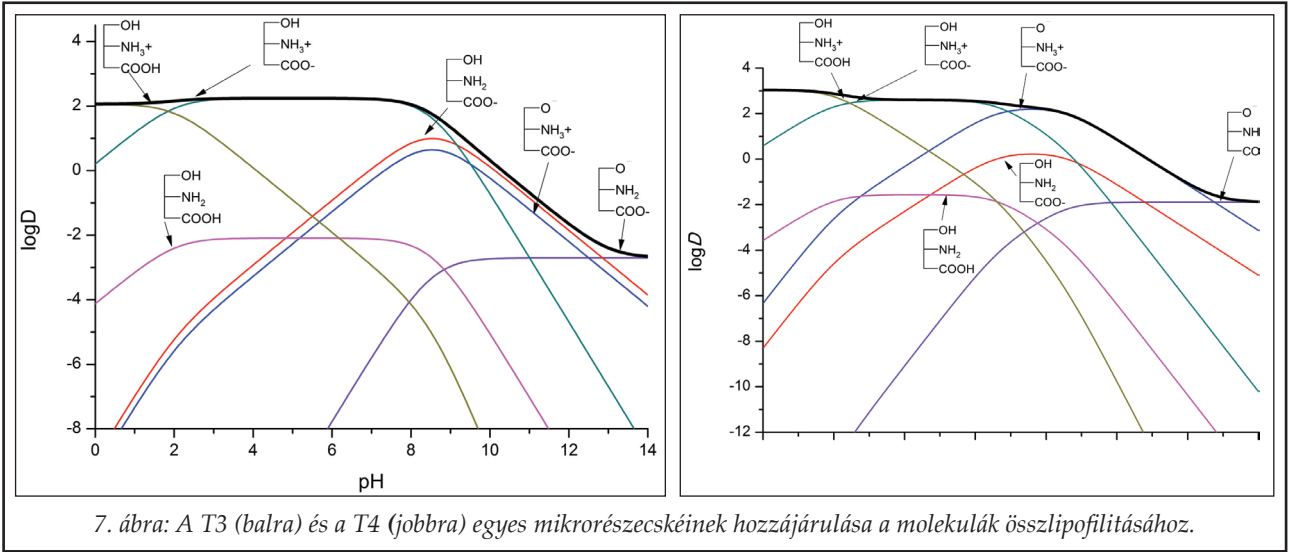
A *D* értékeit ezekben az esetekben azokon a pH-kon határoztuk meg, ahol a semleges részecskék illetve az egyszerűen negatív töltésű részecskék előfordulása a legnagyobb (pH (a) és pH (c) a VII. táblázatban).

A fenti módszerrel meghatározott, összesen 30 részecske-specifikus megoszlási hányadost a VIII. táblázatban foglaltuk össze.

A VII. és VIII. táblázat értékeiből az anyavegyületek esetén a következő lipofilitás sorrend állítható fel: T4 > rT3 > T3 > DIT > MIT. Nyilvánvaló, hogy a hormonok lipofilitása nagyobb, mint az előanyagoké, illetve, hogy a molekulában található jódd atomok számának növekedésével a lipofilitás is nő. Megfigyelhető az is, hogy a rT3 összes mikrorészecskéjének lipofilitása nagyobb, mint a T3 megfelelő mikrorészecskéié, annak ellenére, hogy ezek a molekulák szerkezeti izomerek

és pl. Marvin programmal végzett számítógépes log*P* predikciójuk alapján lipofilitásuk azonos. Ez az eredmény is jól mutatja a nehezen előre jelezhető tényezők – pl. sztérikus – szerepét az egyes molekulák lipofilitásának kialakításában [37].

Az általunk meghatározott log*p* értékek azt mutatják, hogy a pajzsmirigyhormonok lipofilitását döntően a jódozott aromás gyűrűrendszer határozza meg. Emiatt megfigyelhető, hogy a pajzsmirigyhormonok esetén a karboxilát észterek lipofilitása nem tér el szignifikánsan az anyavegyület lipofilitásától, míg a fenolos hidroxilcsoport metilézése megnöveli a log*D* értéket, mivel ez utóbbi változás közvetlenül a lipofil aromás központot befolyásolja. Látható az adatokból továbbá, hogy a fenolos hidroxil deprotonálódása nagyobb változást okoz a molekulák lipofilitás értékében, mint bármelyik másik funkciós csoport (de)protonálódása.



VIII. táblázat

A T4, T3, rT3, DIT és MIT mikroszkopikus megoszlási hányadosok oktanol/víz rendszerben 25°C-on, 0,15 M ionerősségnél [35, 36].

	T4	T3	rT3	DIT	MIT
(O <sup>-</sup> , NH <sub>2</sub> , COO <sup>-</sup> )	-1,89	-2,70	-2,58	<-4	<-5
(OH, NH <sub>2</sub> , COO <sup>-</sup> )	2,26	1,72	1,86	-0,98	-1,72
(O <sup>-</sup> , NH <sub>3</sub> <sup>+</sup> , COO <sup>-</sup> )	2,27	1,13	1,27	-1,35	-2,19
(OH, NH <sub>2</sub> , COOH)	2,98	2,52	2,66	0,72	0,01
(OH, NH <sub>3</sub> <sup>+</sup> , COO <sup>-</sup> )	2,60	2,24	2,39	-0,04	-0,79
(OH, NH <sub>3</sub> <sup>+</sup> , COOH)	3,04	2,06	2,18	-0,51	-1,38



A pajzsmirigyhormonok részecske-specifikus megoszlási hányadosai azt mutatják, hogy ezen vegyületek amfifil tulajdonságúak, hiszen egy hidrofíll oldalláncsal és egy lipofíll aromás gyűrűrendszerrel rendelkeznek. A vegyületek e tulajdonsága lehet a molekuláris magyarázata, hogy a pajzsmirigyhormonok nem passzív diffúzióval jutnak át a membránokon, hanem transzporter molekulák által elősegített energiaigényes folyamatban. Ennek oka, hogy a hormonok, mint amfifil vegyületek könnyen bejutnak, utána azonban megrekednek a membránban, így energia-befektetés nélkül nem jutnak be az intracelluláris térbe [38].

A mikroszkopikus megoszlási hányados értéket (VIII. táblázat) felhasználva számolható és ábrázolható az egyes mikrorészecskék hozzájárulása a látszólagos megoszlási hányadoshoz. A 7. ábrán a T4 illetve a T3 egyes mikrorészecskéinek hozzájárulása látható a vegyületek lipofilitás pH-profiljához. A vastag fekete vonal a molekulák összlipofilitás pH-profilja, amely a megfelelő mikrorészecskék lipofilitáshoz való egyedi hozzájárulásának az összege.

Közös minden vizsgált molekulában, hogy pH 1,8 alatt az egyszeresen pozitív töltésű mikrorészecske ( $\text{OH}$ ,  $\text{NH}_3^+$ ,  $\text{COOH}$ ), míg pH 13 fölött a kétszeresen negatív töltésű mikrorészecske ( $\text{O}^-$ ,  $\text{NH}_2$ ,  $\text{COO}^-$ ) lipofilitása dominál. Köztes pH-kon, így a vér pH-ján is az egyes mikrorészecskék hozzájárulása a vegyület bruttó lipofilitásához eltér molekula-specifikusan. pH 7,4-en T3 esetén az ikerionos mikrorészecske ( $\text{OH}$ ,  $\text{NH}_3^+$ ,  $\text{COO}^-$ ) míg T4 esetén egy, a fenoláton anionos forma ( $\text{O}^-$ ,  $\text{NH}_3^+$ ,  $\text{COO}^-$ ) a legjelentősebb a vegyületek megoszlási tulajdonságának kialakításában. Ez a különbség lehet molekuláris szinten a magyarázata az egyes pajzsmirigyhormonok eltérő kötődésének különböző membránalkotó molekulákhoz [39].

A 7. ábrán szembevetendő, hogy a töltés nélküli részecske hozzájárulása a molekulák lipofilitásához minden pH-n elhanyagolható, amely jól mutatja, hogy amfoter vegyületek esetén szükség van a lipofilitás részecske-specifikus jellemzésére, hiszen – a széles körben elterjedt vélekedéssel szemben – korántsem biztos, hogy egy molekula bruttó lipofilitásához a töltés-mentes részecske hozzájárulása a legnagyobb [12, 14].

### Következtetések

A pajzsmirigyhormonok biokémiai életútjának

szinte minden lépése pH-függő, melynek egyes lépései a hormonok illetve előanyagaik megfelelő protonáltsági állapotában játszódnak le, ezért a vegyületek részecske-specifikus tulajdonságainak meghatározása kulcsfontosságú a pajzsmirigyhormonok biokémiai folyamatainak (szub)molekuláris szintű megértéséhez. Jelen közleményünkben a pajzsmirigyhormonok és biológiai előanyagaik részecske-specifikus bázicitiásának és lipofilitásának meghatározását foglaltuk össze, illetve tanulmányoztuk a pajzsmirigyhormonok mikrorészecskéinek kötődését pajzsmirigyhormon-receptorokhoz *in silico* dokkolással. A részecske-specifikus bázicitás adatok ismeretében a pajzsmirigyhormonok bioszintézise molekuláris szinten magyarázható. Mikrospeciációs és dokkolási adataink összevetéséből az derül ki, hogy a receptor-kötődésben a pajzsmirigyhormonok aminosav oldalláncának protonáltsági állapota meghatározó, továbbá megállapítható, hogy nem a vér pH-ján legnagyobb valószínűséggel előforduló mikrorészecske kötődése a legkedvezőbb a receptorhoz. A vegyületek részecske-specifikus lipofilitása a hormonok membrántranszportjának vizsgálatában kulcsfontosságú. Eredményeink lehetőséget teremtenek a pajzsmirigyhormonok biokémiájának mélyebb megértéséhez, továbbá új gyógyszer-molekulák kifejlesztésére számos pajzsmirigybetegekben.

### Köszönetnyilvánítás

Ez a munka az Új Széchenyi Terv (TÁMOP 4.2.1.B-09/1/KMR) és az Országos Tudományos Kutatási Alapprogramok (OTKA K7380) támogatásával valósult meg.

### IRODALOM

1. Noszál, B.: Acid-base properties of bioligands. In: Burger K (ed.) Biocoordination Chemistry: Coordination Equilibria in Biologically Active System, Ellis Horwood: Chichester, 1990. pp. 18-55.
2. Noszál, B., Mazák, K., Szakács, Z.: Acta Pharm. Hung. 69, 108-114 (1999).
3. Noszál, B., Scheller-Kratiger, V., Martin, R. B.: J. Am. Chem. Soc. 104, 1078-1081 (1982).
4. Stathatos, N.: Med. Clin. N. Am. 96, 165-173 (2012)
5. Tóth, G., Noszál, B.: Acta Pharm. Hung. 83, 1-11 (2013)
6. Rusu, A., Hancu, G., Völgyi, G., Tóth, G., Noszál, B., Gyéresi, Á.: J. Chrom. Sci. doi: 10.1093/chromsci/bmt107 (2013)
7. Orgován, G., Noszál, B.: J. Pharm. Biomed. Anal. 54, 958-964 (2011)
8. Ebert, L.: Z. Phys. Chem. 121, 385-400 (1926)
9. Szakács, Z., Noszál, B.: J. Math. Chem. 26, 139-155 (1999)



10. Hansch, C.: On the future of QSAR, in: Wermuth, C. G., Koga, N., König H. (Eds.), *Medicinal chemistry for the 21st century*, Metcalf Blackwell: Oxford, 1994. pp. 281–293.
11. Tayar, N. E., Watterbeemd H. V., Testa, B.: *J. Chrom. A* 320, 305–312 (1985)
12. Mazák, K., Kökösi, J., Noszál, B.: *Eur. J. Pharm. Sci.* 44, 68–73 (2011)
13. Mazák, K., Noszál, B.: *Eur. J. Pharm. Sci.* 45, 205–210 (2012)
14. Mazák, K., Noszál, B.: *J. Med. Chem.* 55, 6942–6947 (2012)
15. Ishigami, K., Katsuta, R., Shibata, C., Hayakawa, Y., Watanabe, H., Kitahara, T.: *Tetrahedron* 65, 3629–3638 (2009)
16. Izumiya, N., Nagamatsu, A.: *Bull. Chem. Soc. Jpn.* 25, 265–267 (1952)
17. Loeser, A., Ruland, H., Trikojus, V. M.: *Arch. Exp. Path. Pharm.* 189, 664–665 (1938)
18. Purlee, E. L.: *J. Am. Chem. Soc.* 81, 263–272 (1959)
19. Hwang, T. L., Shaka, A. J.: *J. Magn. Reson. A* 112, 275–279 (1995)
20. Schrödinger Suite (2011) Protein Preparation Wizard; Epik version 2.2, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2011; Impact version 5.7, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2011; Prime version 3.0, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2011
21. Friesner, R. A., Murphy, R. B., Repasky, M. P., Frye, L. L., Greenwood, J. R., Halgren, T. A., Sanschagrin, P. C., Mainz, D. T.: *J. Med. Chem.* 49, 6177–6196 (2006)
22. de Araujo A. S., Martinez, L., de Paula Nicoluci, R., Skaf, M. S., Polikarpov, I.: *Eur. Biophys. J.* 39, 1523–1536 (2010)
23. Boyer, S. H., Jiang, H., Jacintho, J. D., Reddy, M. V., Li, H., Li, W., Godwin, J. L., Schulz, W. G., Cable, E. E., Hou, J., Wu, R., Fujitaki, J. M., Hecker, S. J., Erion, M. D.: *J. Med. Chem.* 51, 7075–7093 (2008)
24. Erion, M. D., Cable, E. E., Ito, B. R., Jiang, H., Fujitaki, J. M., Finn, P. D., Zhang, B. H., Hou, J., Boyer, S. H., van Poelje, P. D., Linemeyer, D. L.: *Proc. Natl Acad Sci USA* 104, 15490–15495 (2007)
25. Tóth, G., Hosztafi, S., Kovács, Z., Noszál, B.: *J. Pharm. Biomed. Anal.* 61, 156–164 (2012)
26. Martin, R. B., Edsall, J. T., Wetlaufer, D. B., Hollingworth, B. R.: *J. Biol Chem.* 233, 1429–1435 (1958)
27. De Vijlder, J. J., Den Hartog, M. T.: *Eur. J. Endocrinol.* 138, 227–231 (1998)
28. Farwell, P. A.; Braerman, L. E.: Thyroid and antithyroid drugs. In Goodman, L. S.; Gilman, A.; Brunton, L. L.; Lazo, J. S.; Parker, K. L. (eds.) *Goodman & Gilman's the pharmacological basis of therapeutics*, 11th ed.; McGraw-Hill: New York, 2006. pp. 1563–1596.
29. Andrea, T. A., Dietrich, S. W., Murray, W. J., Kollman, P. A., Jorgensen, E. C., Rothenberg, S.: *J. Med. Chem.* 22, 221–232 (1979)
30. Du, J., Qin, J., Liu, H., Yao, X.: *J. Mol. Graph. Model.* 27, 95–104 (2008)
31. Natesan, S., Wang, T., Lukacova, V., Bartus, V., Khandelwal, A., Balaz, S.: *J. Chem. Inf. Model.* 51, 1132–1150 (2011)
32. Hennemann, G., Docter, R., Friesema, E. C., de Jong, M., Krenning, E. P., Visser T. J.: *Endocr. Rev.* 22, 451–476 (2001)
33. Feldt-Rasmussen, U., Rasmussen, A. K.: Thyroid hormone transport and action. In: Krassas, G. E., Rivkees, S. A., Kiess, W. (eds.) *Diseases of the thyroid in Childhood and Adolescence*. Karger, Basel, 2007. pp 80–103
34. Tóth, G., Baska, F., Schretner, A., Rácz, Á., Noszál, B.: *Eur. Biophys. J.* 42, 721–730
35. Mazák, K., Tóth, G., Kökösi, J., Noszál, B.: *Eur. J. Pharm. Sci.* 47, 921–925 (2012)
36. Tóth, G., Mazák, K., Hosztafi, S., Kökösi, J., Noszál, B.: *J. Pharm. Biomed. Anal.* 76, 112–118 (2013)
37. Altomare, C., Carrupt, P., Tayar, N., Testa, B., Nagatsu, T.: *Helv. Chim. Acta* 74, 290–296 (1991)
38. Hennemann, G., Docter, R., Friesema, E. C., de Jong, M., Krenning, E. P., Visser T. J.: *Endocr. Rev.* 22, 451–476 (2001)
39. Hillier, A. P.: *J. Physiol.* 211, 585–597 (1970)

Érkezett: 2014. január 27.

## Új lehetőség farmakológiai agonisták receptorközei koncentrációjának becslésére: a receptoriális válaszkészség módszer (RRM)

PÁK KRISZTIÁN, KISS ZSUZSANNA, ERDEI TAMÁS, KÉPES ZITA,  
GESZTELYI RUDOLF\*

Debreceni Egyetem, Gyógyszerésztudományi Kar, Gyógyszerhatástani Tanszék,  
Adenozin-farmakológiai Kutatócsoport, Debrecen, Nagyerdei krt. 98. – 4032

\*Levelező szerző: Debreceni Egyetem, Gyógyszerésztudományi Kar, Gyógyszerhatástani Tanszék, 4032-Debrecen, Nagyerdei krt. 98.

„When you can measure what you are speaking about, and express it in numbers,  
you know something about it, ... whatever the matter may be.”

(„Ha mérni tudod, amiről beszélsz, és ki tudod fejezni számokban,  
akkor tudsz róla valamit, ... akármi is legyen az.”)  
Lord Kelvin

### Summary

Pak K, Kiss Z, Erdei T, Kepes Z, Gesztelyi R: **The receptorial responsiveness method (RRM), a new possibility to estimate concentration of pharmacological agonists at their receptors**

Cardiovascular disease is the biggest challenge in terms of life expectancy in developed countries. Adenosine contributes to the adaptation of the heart to ischemia and hypoxia, because adenosine, in addition to its metabolite role in the nucleic acid metabolism, is the endogenous agonist of the ubiquitous adenosine receptor family. Adenosine receptor activation is beneficial in most cases, it improves the balance between energy supply and consumption, reduces injury caused by stressors and inhibits the unfavorable tissue remodeling. Pharmacological manipulation of cardioprotective effects evoked by adenosine is an important, although to date not sufficiently utilized endeavor that may have therapeutic and preventive implications in cardiovascular diseases.

As the ligand binding site of adenosine receptors is accessible from the extracellular space, it is especially important to know the adenosine concentration of the interstitial fluid ( $[Ado]_{ISF}$ ). However, in the functioning heart,  $[Ado]_{ISF}$  values range in an extremely wide interval, spanning from nano- to micromolar concentrations, as estimated by the commonly used methods. Our recently developed procedure, the receptorial responsiveness method (RRM), may resolve this problem in certain cases. RRM enables quantification of an acute increase in the concentration of a pharmacological agonist, uniquely in the microenvironment of the receptors of the given agonist. As a limitation, concentration of agonists with short half-life (just like adenosine) at their receptors can only be quantified with the equieffective concentration of a stable agonist exerting the same action.

In a previous study using RRM, inhibition of the transmembrane nucleoside transport in the euthyroid guinea pig atrium produced an increase in  $[Ado]_{ISF}$  that was equieffective with  $18.8 \pm 3$  nM CPA ( $N^6$ -cyclopentyladenosine, a stable, selective  $A_1$  adenosine receptor agonist). This finding is consistent with observations of others, i.e., in the normoxic heart, adenosine flow is

directed into the cell interior, and thus transport blockade elevates the extracellular adenosine level. In turn, nucleoside transport inhibition in the hyperthyroid guinea pig atrium caused a rise in  $[Ado]_{ISF}$  equieffective with  $46.5 \pm 13.7$  nM CPA. In sum, our work team was the first to demonstrate that adenosine transport in the hyperthyroid atrium has the same direction but is more intense as/than that in the euthyroid one.

**Keywords:** interstitial adenosine concentration, heart, atrium, RRM

### Összefoglalás

A fejlett országokban a szív- és érrendszeri betegségek jelentik a legnagyobb kihívást a várható élettartam szempontjából. Az adenozin hozzájárul a szív ischaemiával és hypoxiával szembeni adaptációjához, mivel a nukleinsav anyagcserében betöltött metabolit szerepén túl az ubikviter előfordulású adenozin receptor család endogén agonistája is. Az adenozin receptor aktiváció a legtöbb esetben kedvező, javítja az egyensúlyt az érintett szövet energiaellátása és energiafelhasználása között, mérsékli a stresszorok okozta károsodást, valamint gátolja a kedvezőtlen szöveti remodellinget is. Az adenozin által kiváltott kardioprotektív hatások farmakológiai befolyásolása a szív- és érrendszeri betegségek elleni küzdelem egyik fontos, de eddig még kellően ki nem használt lehetősége.

Mivel az adenozin receptorok ligandkötőhelye az extracelluláris tér felé néz, kiüntetett jelentősége van az intersticiális folyadék adenozin koncentrációjának ( $[Ado]_{ISF}$ ). A működő szív  $[Ado]_{ISF}$  értékét azonban a jelenleg általánosan alkalmazott módszerek extrém tág, a nanomoláristól a mikromolárisig terjedő tartományban becsülik. Erre a problémára bizonyos esetekben megoldást jelenthet közelmúltban kifejlesztett eljárásunk, az ún. receptoriális válaszkészség módszer (receptorial responsiveness method: RRM). Az RRM egy farmakológiai értelemben vett agonista koncentrációjának akut növekedését képes mennyiségileg jellemezni, egyedülálló módon az agonista receptorainak mikrokörnyezetében. Rövid féléletidejű agonisták (mint amilyen élő szövetben az adenozin is) receptorközei koncentrációját az RRM csak egy azonos hatást

kifejtő, de stabil agonista ekvielektív koncentrációjaként tudja meghatározni.

Egyik vizsgálatunkban, amelyben az RRM-et alkalmaztuk, a transzmembránális nukleozid transzport gátlása  $18.8 \pm 3$  nM CPA-val ( $N^6$ -cyclopentyladenosine, stabil, szelektív  $A_1$  adenosin receptor agonista) ekvielektív  $[Ado]_{ISF}$  emelkedést hozott létre euthyreoid tengerimalac pitvaron. Ez összhangban van mások azon megfigyelésével, hogy normoxiás szívben az adenosin a sejtek belseje felé áramlik, így a transzport gátlása növeli az

extracelluláris adenosin-szintet. Hyperthyreoid pitvaron viszont a nukleozid transzport gátlásakor az  $[Ado]_{ISF}$  emelkedése  $46.5 \pm 13.7$  nM CPA-val volt ekvielektív. Ezzel munkacsoportunk elsőként mutatta ki, hogy hyperthyreoid pitvaron az adenosin transzport változatlan irányú, de intenzívebb, mint euthyreoid állapotban.

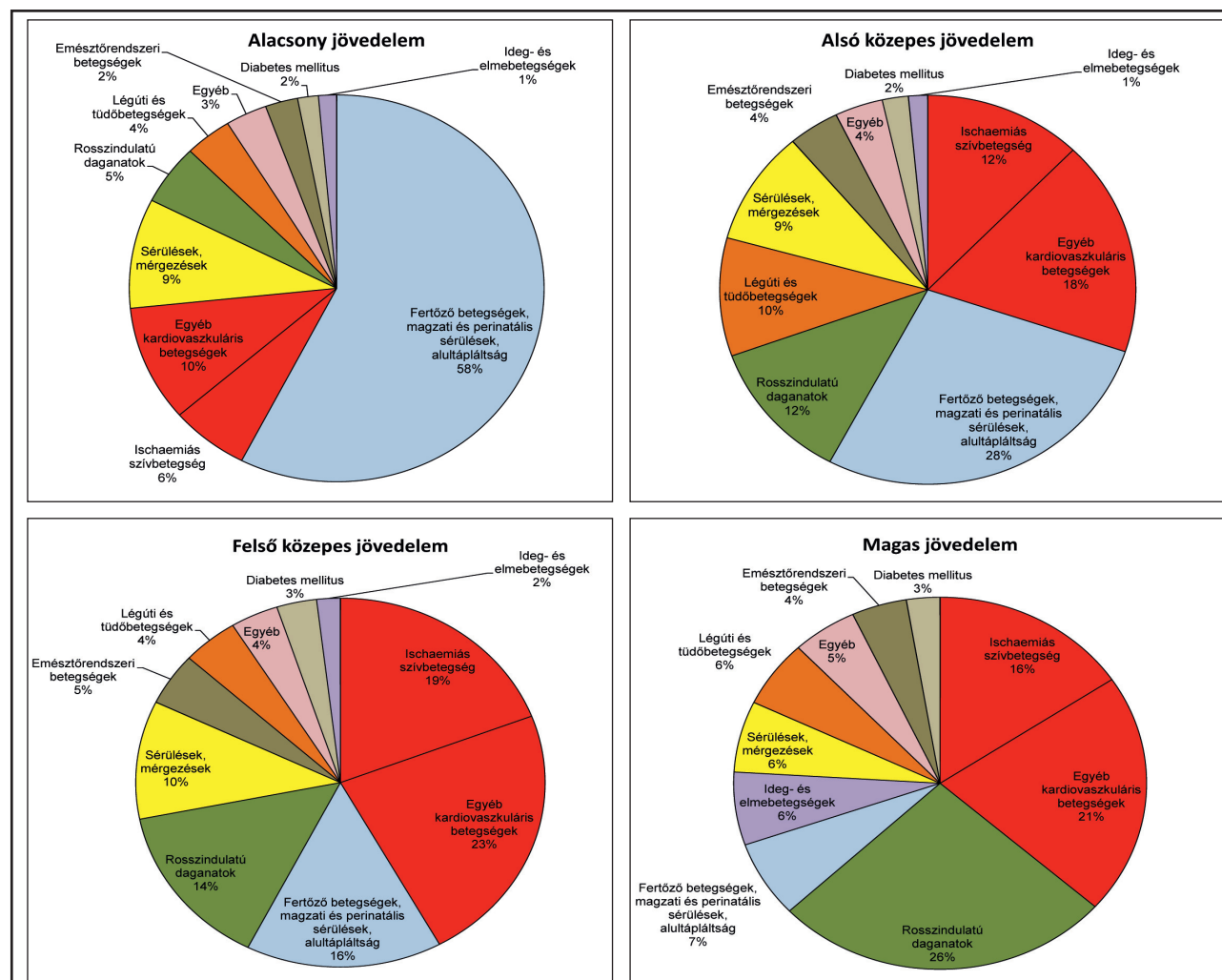
**Kulcsszavak:** intersticiális adenosin koncentráció, szív, pitvar, RRM.

## A szív- és érrendszeri betegségek jelentősége

Bár jelen írásunk elsődleges célja új, farmakológiai agonisták koncentrációjának becslésére alkalmas módszerünk bemutatása, először a fejlett országokat sújtó legnagyobb népegészségügyi problémáról teszünk említést. Tesszük ezt azért, mert módszerünk abból az alapkutatásból fejlődött ki, ami ehhez a területhez, a kardiovaszkuláris rendszert

érintő kóros állapotokhoz kapcsolódik. Ezt a fonalat követve ejtünk néhány szót kutatásunk szűkebb területéről, az adenosin szerepéről a szívben, majd módszerünk elvének leírása után – szűkebb területünkhöz visszatérve – bemutatjuk egy gyakorlati probléma megoldását is a módszer segítségével.

Az alacsony jövedelmű országokban élők számára az alapvető szükségletekben mutatkozó hi-



1. ábra: A főbb halálokok aránya 2008-ban a világ országainak életszínvonal szerint bontott 4 csoportjában. Magyarország a magas jövedelmű kategóriában van. A piros szín jelzi a kardiovaszkuláris betegségek okozta halálozást (WHO, 2012).

ány és a fertőző betegségek jelentik a legfőbb kihívást a várható élettartam szempontjából. Ezzel szemben már az alsó közepes jövedelemmel rendelkező országokban is az élre kerülnek a kardiovaszkuláris betegségek mint a legjelentősebb halálloki csoport, és ezt a vezető helyet megtartják a felső közepes és a magas jövedelmű országokban is. Ezzel összhangban Magyarországon is a szív- és érrendszeri betegségek jelentik a legnagyobb veszélyt a várható élettartam és az életminőség szempontjából, megelőzve a legkomolyabb riválisnak számító rosszindulatú daganatos betegségeket (1. ábra). A keringési rendszer betegségei többségükben a nagyvérköri artériák atherosclerosisára vezethetők vissza, ami rendszerint érinti a szívet ellátó koszorúereket is. Ennek következtében az ischaemiás szívbetegség az egyik vezető halálok a jobb életszínvonalon élők számára (1. ábra).

Érdekes fejlemény ugyanakkor, hogy a magas jövedelmű országokban a kardiovaszkuláris betegségek (és ezeken belül is az ischaemiás szívbetegség) aránya csökkenni kezdett a többi halállokhhoz képest (1. ábra). Ez a kedvező trend egyrészt a felvilágosító kampányok hatására teret hódító egészségtudatosabb életvitelnek köszönhető, másrészt a korszerű diagnosztikus és terápiás beavatkozások szélesebb körű hozzáférhetőségének. (Magyarország ezen a téren sajnos le van maradva a többi magas jövedelmű országhoz képest.) A magasabb életszínvonal tehát nem szükségszerűen okoz nagyobb kardiovaszkuláris kockázatot, megfelelő életvitellel és korszerű terápiával sokat lehet tenni a szív és az erek egészségéért.

Az ischaemiás szívbetegség elleni küzdelem leghatékonyabb módja az atherosclerosis megelőzése. A már kialakult koronária-szklerózisban szenvedők számára az alapproblémát megszüntetni nem tudó gyógyszeres terápia és a nem kockázatmentes invazív megoldások jönnek szóba. Új, ígéretes lehetőségnek számít ugyanakkor a szív ischaemiával szembeni endogén védekezőképességének farmakológiai úton való fokozása. Ennek egyik módja a purinerg szabályozó rendszer kiaknázása.

A purinerg transzmisszió az egyik legősibb és legelterjedtebb intercelluláris jelzőrendszer a szervezetben (Burnstock és mtsai, 2010). Ezen belül az adenozinerg rendszer részt vesz csaknem minden szövet funkcióinak szabályozásában. Az adenozin receptorok aktivációja a legtöbb esetben kedvező, javítja az egyensúlyt az érintett szövet energiaellátása és energiafelhasználása között, mérsékli a

stresszorok okozta károsodást, valamint gátolja a kedvezőtlen szöveti remodellinget (Fredholm és mtsai, 2001, 2011; Headrick és mtsai, 2003, 2011, 2013). Ily módon az adenozin receptorok komoly farmakológiai lehetőségeket rejtő célterületet képeznek. Néhány adenozinerg szert már sikeresen bevezettek a kardiovaszkuláris betegségek diagnosztikájába illetve terápiájába, emellett új szerek és új indikációk vizsgálata is folyik. A szív adenozinerg mechanizmusainak farmakológiai befolyásolása világszerte a kutatás élvonalában van (Elzein és Zablocki, 2008; Manjunath és Sakhare, 2009; Schenone és mtsai, 2010; Burnstock és mtsai, 2010; Fredholm, 2010; Müller és Jacobson, 2011; Szentmiklósi és mtsai, 2011; Headrick és mtsai, 2011, 2013; Albrecht-Küpper és mtsai, 2012).

### Az adenozin szerepe a szív védelmében

Az adenozin a nukleinsav anyagcsere kiemelt jelentőségű molekulája, mivel metabolit szerepén túl az adenozin receptorok családjának endogén agonistája. Ez a többi nukleozidhoz képest kitüntetett szerep annak köszönhető, hogy az adenozin a szervezet energiaforgalmában központi szerepet betöltő ATP (adenozin-5'-trifoszfát) prekursora és egyben bomlásterméke, így a többi nukleozidnál érzékenyebben jelzi a szervezet energetikai státuszát. Ha megfelelő a sejtek energia-ellátottsága, a keletkező adenozin zöme ATP-vé alakul. Az energiatermelés zavara esetén viszont az adenozin először intracellulárisan, majd extracellulárisan is felhalmozódik, az adenozin koncentráció növekedése tehát a sejtek kimerülésére utal (Deussen, 2000a, 2000b; Fredholm és mtsai, 2001; Headrick és mtsai, 2003, 2011, 2013). Az adenozin markáns biológiai hatásait egyébként először a szíven figyelték meg (Drury és Szent-Györgyi, 1929; Burnstock és mtsai, 2010).

Az adenozin extracellulárisan és intracellulárisan is folyamatosan keletkezik illetve átalakul, féléletideje gyors metabolizmusa miatt rövid (emlős szövetekben 0.6 – 10 s) (Wilbur és Marchlinski, 1997; Pavan és Ijzerman, 1998). Az adenozin aktív és passzív transzporttal egyaránt átléphet a sejtek membránján: előbbi koncentratív (CNT), utóbbi ekvibratív (ENT) nukleozid transzportereken keresztül történik. A szívben elsősorban ENT található, azon belül is ENT1, melynek szelektív gátlója az NBTI (nitrobenzylthioinosine) (Conant és Jarvis, 1991, 1994; Thorn és Jarvis, 1996). Ily módon a cardiomyocyták nukleozid transzportjának irányát és intenzitását döntően az extra- és intra-



celluláris adenosin koncentráció különbsége határozza meg. Energetikai egyensúlyban levő cardiomyocytákban az adenosin transzport a sejtek belseje felé irányul (Deussen és mtsai, 1999; Deussen, 2000a, 2000b).

Az adenosin receptorokat három típusba sorolják:  $A_1$ ,  $A_2$  és  $A_3$ ; az  $A_2$ -t pedig további két altípusra osztják:  $A_{2A}$  és  $A_{2B}$ . Az adenosin receptorok hét transzmembrán doménal rendelkező, G protein-kapcsolt receptorok, melyek kötőhelye az extracelluláris tér felé néz (Fredholm és mtsai, 2001, 2011; Ijzerman és mtsai, 2012). Noha az adenosin receptorok a szívben fiziológias viszonyok között is részt vesznek egyes működések szabályozásában, igazán fontos szerephez patológiás körülmények közt (pl. ischaemia) jutnak. Ilyenkor az intersticiális adenosin koncentráció eléggé megemelkedik ahhoz, hogy számottevően ingerelje a sejtfelszíni adenosin receptorokat (Tune és mtsai, 2000; Headrick és mtsai, 2003, 2011, 2013). Az  $A_{2A}$  és  $A_{2B}$  altípusok elsősorban a szív ereinek tónusát és a gyulladásos válasz kialakításában szereplő sejtek aktivitását befolyásolják, ezáltal a szívizomra kifejtett hatásuk döntően közvetett. Az  $A_1$  és  $A_3$  típusok a cardiomyocyták felszínén is jelentős mértékben expresszálódnak, ezáltal közvetlen myocardialis hatással is rendelkeznek. E két utóbbi típus közül az  $A_1$  adenosin receptor ( $A_1$  receptor) kardioprotektív szerepéről rendelkezünk a legtöbb bizonyítékkal (Sommerschild és Kirkeboen, 2000, 2002; Headrick és mtsai, 2003, 2011, 2013; Fredholm és mtsai, 2001, 2011).

Az  $A_1$  adenosinerg mechanizmusokat befolyásoló szerek egy része  $A_1$  receptor agonista. Ezek alkalmazásának célja, hogy az adott szöveten elindítsák azokat a protektív illetve regeneratív folyamatokat, amelyeket egyébként az endogén adenosin vált ki (Elzein és Zablocki, 2008; Fredholm, 2010; Schenone és mtsai, 2010; Müller és Jacobson, 2011; Szentmiklósi és mtsai, 2011; Albrecht-Küpper és mtsai, 2012). A szintetikus  $A_1$  receptor agonisták általában stabilabb vegyületek az adenosinnál, jobban ellenállnak az adenosin metabolizmusában szereplő enzimeknek, mint az adenosin (Pavan és Ijzerman, 1998; Fredholm és mtsai, 2001, 2011). Emiatt a szintetikus  $A_1$  receptor agonisták koncentráció-hatás (E/c) görbéiből megbízhatóbb adatokhoz lehet jutni az  $A_1$  receptor működéséről, mert ezek a E/c görbék kevésbé függenek az adenosinra specifikus enzimek aktivitásától.

Mivel az adenosin protektív és reparatív hatásait közvetítő receptorok ligandkötőhelye az extracelluláris tér felé néz, kitüntetett jelentősége

van az intersticiális folyadék adenosin koncentrációjának ( $[Ado]_{ISF}$ ). Az  $[Ado]_{ISF}$  és az ebben beálló változások nemcsak a meglévő kardioprotektív szerek hatásmechanizmusának megértéséhez fontosak, hanem az új molekulák fejlesztése szempontjából is.

### Az intersticiális adenosin koncentráció meghatározása működő szívben

A legkülönbözőbb kémiai sajátosságokkal bíró illetve molekulaméretű anyagok koncentrációjának meghatározására sokféle és többségében megbízható módszer áll rendelkezésre. Napjainkban is komoly problémát jelent azonban a rövid féléletű molekulák szintjének mérése az élő szövetekben, különösen mozgó szövetben, továbbá akkor, ha a mérendő anyagok inhomogénen oszlanak el és koncentrációjukra egy bizonyos szöveti kompartmentben vagyunk kíváncsiak. Ilyen kihívás működő szívben az  $[Ado]_{ISF}$  becslése is.

Laboratóriumi rágcsőkon a legmagasabb bazális  $[Ado]_{ISF}$  értékeket a myocardialis interstitium mikrodialízisével (160 nM - 2.8  $\mu$ M), illetve az endocardialis „well” technikával (3.6 - 4.6  $\mu$ M) nyerték. (A „well” porózus falú korong vagy zacskó, amelynek folyadéktartalma a mérendő szövettel szoros kontaktusba helyezve annak intersticiális folyadékával ekvilibráliódik a permeabilis anyagokra nézve. Ezek koncentrációit a „well” folyadékában lemérve következtetnek a szöveti koncentrációkra.) A pericardialis transzudátumból és az epicardialis „well” folyadékából meghatározott bazális  $[Ado]_{ISF}$  100 - 400 nM között mozog. Az epicardialis és az endocardialis értékek figyelemreméltó, egy nagyságrendnyi transzmurális  $[Ado]_{ISF}$  különbségre utalnak (Zhu és mtsai, 1991; Zhu és mtsai, 1992). A legalacsonyabb bazális  $[Ado]_{ISF}$  értékeket (2.6 - 25 nM) az ún. „axially distributed modeling” segítségével határozták meg, ami az arteriovenózus adenosin koncentrációkülönbség, a hematokrit és a coronaria-perfúzió értékei alapján végzett számítás (Stepp és mtsai, 1996) (I. táblázat).

Metabolikusan intakt szívben nettó extracelluláris adenosin termelés és ezzel összefüggésben nettó intracelluláris adenosin elimináció van, ezért a transzmembránális nukleozid transzport gátlása növeli az  $[Ado]_{ISF}$ -t (Deussen, 2000a, 2000b). A bazális  $[Ado]_{ISF}$  értékek nagy szórásával összhangban, ENT1-gátló dipyridamol illetve NBTI jelenlétében az  $[Ado]_{ISF}$  növekedésére kapott értékek is elég széles tartományban helyezkednek el (II. táblázat).

## I. táblázat

Szemelvény az irodalomban található intersticiális adenosin koncentráció ( $[Ado]_{ISF}$ ) értékekből, melyeket elfogadott módszerekkel határoztak meg tengerimalac és patkány szívében. Az *ex vivo* és *in vivo* megjelölések a vizsgálat jellegét mutatják; nM: nmol/l;  $\mu$ M:  $\mu$ mol/l.

<b>Becslés myocardialis interstitiumból mintavételezett folyadék alapján</b>
<i>Mikrodialízis perfuzátum</i>
160 nM; <i>ex vivo</i> patkány; Ninomiya és mtsai, 2002
270 nM; <i>in vivo</i> patkány; Headrick, 1996
400-500 nM; <i>ex vivo</i> patkány; Harrison és mtsai, 1998
470 nM; <i>ex vivo</i> patkány; Van Wylen és mtsai, 1992
2.8 $\mu$ M; <i>in vivo</i> patkány; Obata és mtsai, 2001
<i>Peri- vagy epicardialis transzudátum, infuzátum vagy „well” tartalma</i>
$\approx$ 100-250 nM; <i>ex vivo</i> patkány; Perlini és mtsai, 1998
180 nM; <i>ex vivo</i> tengerimalac; Decking és mtsai, 1988
191 nM; <i>ex vivo</i> tengerimalac; Mohrman és Heller, 1990
300 nM; <i>ex vivo</i> tengerimalac; Zhu és mtsai, 1991 (de: endocardialis „well” módszerrel 3.6 $\mu$ M)
327 nM; <i>ex vivo</i> tengerimalac; Zhu és mtsai, 1992 (de: endocardialis „well” módszerrel 4.6 $\mu$ M)
<b>Becslés a nagyvérköri arteriális és coronaria-vénás Ado szintek alapján</b>
2.6-9.4 nM; <i>ex vivo</i> tengerimalac; Gorman és mtsai, 1991
6.8 nM; <i>ex vivo</i> tengerimalac; Wangler és mtsai, 1989
20-25 nM; <i>ex vivo</i> tengerimalac; Kroll és mtsai, 1992
34 nM; <i>ex vivo</i> tengerimalac; Deussen és mtsai, 1999

## II. táblázat

A bazális intersticiális adenosin koncentráció ( $[Ado]_{ISF}$ ) *ex vivo* meghatározott növekedése nukleozid transzport gátló jelenlétében tengerimalac szívében. A bazális  $[Ado]_{ISF}$  a sorok elején található. A DP (dipyridamol) és az NBTI (nitrobenzylthioinosine) koncentrációit az nukleozid transzport gátló után tüntettük fel zárójelben, ezt követi az  $[Ado]_{ISF}$  nukleozid transzport gátló jelenlétében mért értéke. Az  $[Ado]_{ISF}$  változását ( $\Delta[Ado]_{ISF}$ ) félkövéren szedjük. nM: nmol/l;  $\mu$ M:  $\mu$ mol/l.

<b>Becslés a peri- vagy epicardialis transzudátum, illetve „well” tartalma alapján</b>
180 nM; DP (0.1 $\mu$ M): $\approx$ 1 $\mu$ M; $\Delta[Ado]_{ISF}$ : 820 nM; Decking és mtsai, 1988
191 nM; DP (10 $\mu$ M): 2 $\mu$ M; $\Delta[Ado]_{ISF}$ : 1.8 $\mu$ M; Mohrman és Heller, 1990
<b>Becslés a nagyvérköri arteriális és coronaria-vénás Ado szintek alapján</b>
6.8 nM; DP (10 $\mu$ M): 191 nM; $\Delta[Ado]_{ISF}$ : 184.2 nM; Wangler és mtsai, 1989
34 nM; NBTI (10 $\mu$ M): 94 nM; $\Delta[Ado]_{ISF}$ : 60 nM; Deussen és mtsai, 1999

A különböző módokon meghatározott bazális  $[Ado]_{ISF}$  értékek skálája tehát extrém tág, a nanomoláristól a mikromolárisig terjedő tartományban mozog, vagyis három nagyságrendet (!) ölel fel (I. táblázat). Ezzel összhangban az ENT1 gátlás okozta  $[Ado]_{ISF}$  növekedésre kapott értékek is két nagyságrenden belül változnak (II. táblázat). Ezt a bizonytalanságot csak részben lehet a mintavétel során megcélzott szöveti kompartmentek eltérő voltára visszavezetni, vagyis az alkalmazott módszer erősen befolyásolja az eredményt. Az  $[Ado]_{ISF}$  meghatározása tehát nem tekinthető megoldottnak, ami felveti új, megbízha-

több módszer (vagy módszerek) kidolgozásának szükségességét.

### A receptoriális válaszkészség módszer (RRM)

Bizonyos, később részletezendő feltételek teljesülése esetén a fenti problémára megoldást jelenthet közelmúltban kifejlesztett eljárásunk, az ún. receptoriális válaszkészség módszer (*receptorial responsiveness method*: RRM). Az RRM egy görbeilleszté- sen alapuló módszer, melynek egyenletét E/c görbére kell illeszteni. Az RRM egy farmakológiai értelemben vett agonista koncentrációjának akut nö-

vekedését képes kimutatni illetve mennyiségileg jellemezni, egyedülálló módon az agonista receptorainak mikrokörnyezetében.

Az első lépés a matematikai modell kidolgozása volt (Gesztelyi és mtsai, 2004). Azóta sor került a módszer *ex vivo* (Gesztelyi és mtsai, 2004; Karsai és mtsai, 2006) és *in silico* (Grenczer és mtsai, 2010a, 2010b) tesztelésére, továbbá felhasználására olyan kérdések megválaszolásában, amelyek más módszerekkel nem vagy csak nehezen lettek volna megközelíthetőek (Karsai és mtsai, 2006, 2007; Kemény-Beke és mtsai, 2007; Kiss és mtsai, 2013; Pák és mtsai, 2014). Az RRM – első ránézésre bonyolultnak tűnő, de valójában igen egyszerű – alapelvének megértéséhez először érdemes áttekinteni a hatóanyag koncentráció és a kiváltott biológiai válasz (hatás) kapcsolatának, továbbá a regresszióanalízisnek mint eljárásnak néhány főbb jellegzetességét.

#### A koncentráció és a hatás kapcsolata

A E/c görbék egyik típusa, az ún. fokozatos („graded”) E/c görbe egy derékszögű koordináta rendszerben ábrázolt sztochasztikus kapcsolat egy biológiailag aktív anyag koncentrációja ( $x$  érték) és az általa kiváltott biológiai válasz ( $y$  érték) között. A véletlen (mérési hiba, biológiai variabilitás) szerepének ésszerű határok közé szorítása esetén a E/c görbe egzakt kapcsolatot teremt a hatóanyag koncentráció és a biológiai rendszer viselkedése között. E/c görbéket az alap kutatásban ugyanúgy kiterjedten használnak, mint az alkalmazott kutatásban, pl. gyógyszerjelölt molekulák tesztelésére (Kenakin, 2006).

A kellően nagy koncentráció-tartományt átfogó és precíz E/c görbék kiértékelésére leggyakrabban használt eljárás a regresszióanalízis (görbeillesztés) (Motulsky és Christopoulos, 2004). Regresszióanalízis segítségével két vagy több változó közötti kapcsolat modellezhető, jelen esetben ez a (mért vagy számított) hatóanyag koncentráció és a (mért) hatás közötti kapcsolat. A regresszióanalízis kulcsfontosságú lépése a modell kiválasztása, vagyis azé az egyenleté, amelyet a E/c adatpárookra illesztünk. Az egyenlet a függő változót fejezi ki a független változóból. Ehhez szükség van olyan mennyiségekre, amelyek egy-egy konkrét rendszerben állandóak, de a különböző rendszerek esetén eltérhetnek, vagyis ún. paraméterekre. A regresszióanalízis célja ezen paraméterek konkrét értékének meghatározása az adott E/c görbével jellemzett biológiai rendszer esetében.

A legáltalánosabban alkalmazott modell a ható-

anyag koncentráció és a hatás kapcsolatának leírására a Hill egyenlet (Gesztelyi és mtsai, 2012). A Hill egyenlet eredendően három paramétert tartalmaz (ld.: 1. egyenlet), de módosított formáiban kevesebb vagy több is előfordulhat (Giraldo és mtsai, 2002). A Hill egyenlet az első kvantitatív receptor modell, amelyet napjainkban is széles körben használnak E/c görbék illesztésre, gyakran első tájékozódás céljából (Kenakin, 2006, 2009):

$$E = E_{\max} \cdot \frac{c^n}{c^n + EC_{50}^n} \quad 1. \text{ egyenlet}$$

ahol:  $c$  – az agonista koncentrációja;  $E$  – a hatás;  $E_{\max}$  – az adott agonistával elérhető maximális hatás;  $EC_{50}$  – a félhatásos agonista koncentráció;  $n$  – a Hilloefficiens (Hill slope faktor).

A Hill egyenlet illesztése kétváltozós ( $c$ ,  $E$ ), háromparaméteres ( $E_{\max}$ ,  $EC_{50}$ ,  $n$ ) nemlineáris regresszióanalízis. Görbeillesztési szempontból a Hill egyenlet igen flexibilis, vagyis jelentős hibával terhelt hatás ( $E$ ) adatok esetén is használható becslést ad (Giraldo és mtsai, 2002). Farmakológiai szempontból a Hill modell csaknem teljesen független a receptor jelátviteli mechanizmusaitól (bár feltételezi a E/c görbék szimmetriáját, ami az esetek többségében nagyjából teljesül is). Ennek köszönhetően általánosan használható, viszont paraméterei ( $E_{\max}$ ,  $EC_{50}$ ,  $n$ ) empirikusak, vagyis nem fiziko-kémiai állandók (Giraldo és mtsai, 2002).

#### Az RRM mögött álló jelenség

Az RRM elvét egy gondolat kísérettel szemléltethetjük. Vegyünk egy biológiai rendszert és egy agonistát, amelyik szelektíven izgatja a rendszerben található egyik receptort. Tegyük fel, hogy az adott agonista egy dózist kétszer adjuk a rendszerhez, de a második dózis beadásakor kiindulási állapotnak az első bemérése után kialakult állapotot vesszük. Ekkor a második dózis beadásakor kisebb választ tapasztalunk, mint az első beadásakor. Ezt a jelenséget az magyarázza, hogy az első dózissal beadott agonista molekulák a receptorok egy részéhez kötődve és azokon hatás kiváltva „elhasználták” a rendszer válaszadási kapacitásának egy részét. Emiatt a második dózissal bemért agonista molekulák számára már a maximálisnál kisebb válaszadási kapacitás állt rendelkezésre. Ha a kérdéses dózis például már az első beadásakor (gyakorlatilag) maximális választ eredményez, másodikára adva már nem vált ki hatást,

vagyis teljes válaszképtelenséget tapasztalunk (bővebben ld.: 1. Függelék).

A fenti jelenség, bár felületesen nézve emlékeztet rá, nem a receptorok deszenzitizációján alapszik. Deszenzitizációról akkor beszélünk, amikor a hatás korrekt meghatározás esetén is elmarad a várhatótól. A fenti esetben viszont azért kaptunk csökkent választ az agonista másodszori beadása során, mert nem vettük figyelembe a rendszerben lévő első agonista dózist és az általa kiváltott hatást. Tehát olyan rendszerben is kisebb választ mérünk, amely az első agonista dózis eltávolítása után a második dózisa a szokásos nagyságú választ adná.

A fentiekben bemutatott jelenség akkor is megfigyelhető, ha a másodjára beadott agonista más, mint az első, de a sejtben ugyanazt a hatást váltják ki, tehát ugyanazt a válaszadási kapacitást fogyasztják. Ehhez elég, ha ugyanazon a receptoron agonisták, sőt már az is, ha különböző receptorhoz kötődve, de ugyanolyan módon befolyásolnak egy azonos (vagy nagyban átfedő) poszt-receptorális szignalizációt (Gesztelyi és mtsai, 2004; Grençer és mtsai, 2010a, 2010b).

### A jelenség mögött álló összefüggés

Nevezük a biológiai rendszerbe elsőként kerülő és a későbbiekben figyelmen kívül hagyott agonistát torzító agonistának, míg a rendszerbe másodjára kerülő és figyelembe vett agonistát teszt agonistának. Nevezük továbbá azt a hatást, melyet a teszt agonista a torzító agonista jelenlétében hoz létre, torzult hatásnak, míg a teszt agonista és a torzító agonista korrekt kiértékelés esetén kapható közös hatását torzítatlan hatásnak. A torzult és a torzítatlan hatás között a következő összefüggés áll fenn (Gesztelyi és mtsai, 2004; Grençer és mtsai, 2010a):

$$E' = 100 - \frac{100 \cdot (100 - E)}{100 - E_{\text{bias}}} \quad 2. \text{ egyenlet}$$

ahol:  $E'$  – a torzult hatás (a teszt agonista és a torzító agonista közös hatása, ami a torzító agonista figyelmen kívül hagyása miatt inkorrekt);  $E$  – a torzítatlan hatás (a teszt agonista és a torzító agonista közös hatása korrekt kiértékelés esetén);  $E_{\text{bias}}$  – az a hatás, melyet a torzító agonista önmagában hoz létre (és ami nincs figyelembe véve a torzult hatás meghatározásakor).

Ha egy rendszerben valamely okból megnő egy agonista koncentrációja, a 2. egyenlet alapján lehe-

tőség nyílik az agonista többlet (mint torzító agonista koncentráció) meghatározására. A torzító agonista koncentráció kvantifikálásához definiálnunk kell a hatás és a hatást létrehozó agonista koncentráció közötti kapcsolatot, vagyis modellt kell választanunk. Mivel az  $E$  és az  $E_{\text{bias}}$  egyaránt torzítatlan hatások, kifejezhetők bármely olyan modell alapján, ami kvantifikálja a  $E/c$  kapcsolatot. Az egyik legegyszerűbb és legáltalánosabb ilyen modell a Hill egyenlet (1. egyenlet), amely a hatást az agonista koncentrációjára és három empirikus paraméterre ( $E_{\text{max}}$ ,  $EC_{50}$ ,  $n$ ) vezeti vissza. A Hill egyenlet és a 2. egyenlet kombinálásával a torzult hatás visszavezethető a torzító agonista koncentrációra, a teszt agonista koncentrációra és az intakt (torzítatlan)  $E/c$  kapcsolat Hill modell szerinti jellemzőire ( $E_{\text{max}}$ ,  $EC_{50}$ ,  $n$ ) (Gesztelyi és mtsai, 2004; Grençer és mtsai, 2010a):

$$E' = 100 - \frac{100 \cdot \left( 100 - E_{\text{max}} \cdot \frac{(c_x + c_{\text{test}})^n}{(c_x + c_{\text{test}})^n + EC_{50}^n} \right)}{100 - E_{\text{max}} \cdot \frac{c_x^n}{c_x^n + EC_{50}^n}}$$

### 3. egyenlet

ahol:  $E'$  – a torzult hatás;  $c_{\text{test}}$  – a teszt agonista koncentráció;  $E_{\text{max}}$ ,  $EC_{50}$  és  $n$  – az intakt  $E/c$  kapcsolatot leíró Hill paraméterek;  $c_x$  – ha a torzító és a teszt agonista azonosak, akkor a torzító agonista koncentráció, ha nem, akkor a teszt agonista ugyanakkora hatás kiváltására képes koncentrációja (ld. lentebb).

Mivel a teszt agonista koncentrációt ismerjük, a torzult hatást pedig mérjük, a 3. egyenlet négyismeretlenes. Az ismeretlenek száma 1-re csökkenthető ( $c_x$ ), ha meghatározzuk az intakt  $E/c$  kapcsolatot Hill paramétereit. Ez  $E/c$  görbe felvételével (a rendszer torzító agonista nélküli állapotában) és a  $E/c$  adatok Hill egyenlettel végzett regresszióanalízisével valósítható meg. A Hill paramétereket a 3. egyenletbe beírva kiszámolhatjuk a  $c_x$ -et.

Figyelembe véve, hogy már a teszt agonista koncentrációt is terheli valamekkora számolási/mérési hiba, a torzult hatást és a Hill paramétereket pedig mindenképpen sztochasztikusnak kell tekintenünk, a  $E/c$  adatok feldolgozására az algebrai megközelítésnél sokkal megbízhatóbb módszer a regresszióanalízis. Vagyis, egyetlen teszt agonista koncentráció – torzult hatás pár helyett érdemes a torzító agonista jelenlétében is  $E/c$  görbét felvenni az adott rendszerben (és ezáltal több teszt agonista koncentráció – torzult hatás párhoz jut-



ni). Ha erre a torzult E/c görbére illesztjük a Hill paramétereket tartalmazó 3. egyenletet, megkaphatjuk a  $c_x$  paramétert (a maga jelentésével, ld.: 3. egyenlet illetve lentebb).

Összefoglalva: a torzító agonista koncentráció RRM-mel történő kvantifikációja optimálisan két E/c görbe felvételével oldható meg: az első a torzító agonista koncentráció hiányában, a másodikat pedig jelenlétében kell felvenni (de egyébként ugyanabban a rendszerben). A Hill paramétereket a Hill egyenletnek a torzító agonista hiányában felvett E/c görbére való illesztése adja meg. A Hill paramétereket a 3. egyenletbe beírva az már csak egy paramétert fog tartalmazni ( $c_x$ ). Ez utóbbit pedig megkaphatjuk, ha a Hill paramétereket tartalmazó 3. egyenletet a torzító agonista jelenlétében felvett E/c görbére illesztjük. (Noha elvben a torzult E/c görbére a 3. egyenlet négy paraméterrel is illeszthető, ennek illeszkedése nagyon bizonytalan.) Vagyis az RRM, a Hill egyenlet illesztéséhez hasonlóan, nemlineáris regresszióanalízis. (Az RRM egyenletének általános esetből kiinduló teljes levezetését a 2. Függelék tartalmazza.)

A torzító agonista koncentrációt ( $c_{bias}$ ) a továbbiakban érdemes megkülönböztetni az RRM által szolgáltatott becsléstől ( $c_x$ ). Erre az egyértelműség miatt van szükség, ugyanis a gyakorlati alkalmazás során a  $c_{bias}$  és a  $c_x$  nem feltétlenül ugyanarra az agonistára vonatkozik. Az RRM ugyanis nem igényli a teszt és a torzító agonista egyezését, csak ugyanolyan hatást kell kiváltaniuk ugyanazon a sejten (szöveten). Ha a teszt agonista és a torzító agonista azonos, az RRM közvetlenül a torzító agonista koncentrációját becsli ( $c_x = c_{bias}$ , legalábbis tökéletes becslés esetén). Ha a teszt és a torzító agonista nem ugyanaz, az RRM azt a teszt agonista koncentrációt adja meg, amelyik egyenlő hatást képes kiváltani a torzító agonista koncentrációval (vagyis  $c_x$  és  $c_{bias}$  nem feltétlen egyenlők, de  $E_x = E_{bias}$ , amennyiben a becslés tökéletes) (Gesztesyi és mtsai, 2004; Greczner és mtsai, 2010a).

A közvetlen koncentráció-becslés ugyan hasznosabb eredmény, mint az ekvielektív koncentráció becslése, de az, hogy az RRM megengedi a torzító és a teszt agonista különbözőségét, egyedülálló lehetőséget rejt magában. Ez teszi lehetővé, hogy bomlékony torzító agonisták koncentráció-növekedését stabil és jól diffundáló teszt agonisták segítségével becsüljük meg (még ha egy ekvielektív koncentráció formájában is). A teszt agonista stabilitása és diffúzibilitása ugyanis növeli a meghatározás pontosságát és megbízhatóságát, mivel lehetővé teszi, hogy az agonista homo-

génen oszoljon el a vizsgált rendszerben. Az RRM minden más (koncentráció meghatározásra alkalmas) módszerhez képesti előnye, hogy egy olyan nehezen vizsgálható, de biológiai szempontból fontos szöveti kompartmentről képes információt adni, mint a receptorok mikrokörnyezete (Gesztesyi és mtsai, 2004; Karsai és mtsai, 2006, 2007).

A görbeillesztés pontosságát a regressziós paraméterek standard hibája illetve 95%-os konfidencia intervalluma jellemzi. A legtöbb görbeillesztő szoftver szimmetrikus (ún. aszimptotikus) standard hibát számol és ad meg. Ez (és a belőle számított konfidencia intervallum) azonban csak abban az esetben korrekt, ha a meghatározandó paraméterek szimmetrikus (pl. normális) eloszlásúak. A koncentráció jellegű mennyiségekre ez általában nem teljesül, csak ezek logaritmusára (Motulsky és Christopoulos, 2004). Ezért ha az RRM egyenletét E/c adatokra illesztjük, érdemes az egyenletben szereplő koncentrációk ( $c_{test}$ ,  $c_x$ ,  $EC_{50}$ ) logaritmusát szerepeltetni, vagyis a 3. egyenlet helyett annak átalakított formáját használni a görbeillesztéshez (amelyik algebrailag természetesen ekvivalens a 3. egyenlettel) (Greczner és mtsai, 2010a):

$$E' = 100 - \frac{100 \cdot \left( 100 - \frac{E_{max}}{1 + 10^{n \cdot (\log EC_{50} - \log (0^{\log c_x} + 10^{\log c_{test}}))}} \right)}{100 - \frac{E_{max}}{1 + 10^{n \cdot (\log EC_{50} - \log c_x)}}}$$

4. egyenlet

ahol:  $E'$  – a torzult hatás;  $c_{test}$  – a teszt agonista koncentráció (a E/c görbék felvételéhez használt agonista koncentrációja);  $E_{max}$ ,  $EC_{50}$  és  $n$  – az első E/c görbének ( $c_{bias} = 0$ ) a Hill egyenlet illesztése révén nyert paraméterei;  $c_x$  – a teszt agonista azon koncentrációja, amely ekvielektív a  $c_{bias}$ -szel (ha a teszt és a torzító agonista azonos, akkor  $c_x = c_{bias}$ ). (Ennek megfelelően a 4. egyenletet olyan E/c görbére kell illeszteni, melynek x tengelyén az agonista koncentráció logaritmusát vettük fel.)

Az RRM tehát kétváltozós ( $c_{test}$  és  $E'$ ), egyparaméteres ( $c_x$ ) nemlineáris regresszióanalízis. A meghatározás két E/c görbe felvételét igényli ugyanabban a rendszerben: egy intakt (torzítatlan) E/c görbéét és egy olyanét, amelyben már jelen van a meghatározandó (torzító) agonista koncentráció (Gesztesyi és mtsai, 2004; Greczner és mtsai, 2010a).

#### Az RRM alkalmazásának feltételei

Az RRM alkalmazásának több feltétele is van, melyek teljesülése befolyásolja a módszer pontosságát (Gesztesyi és mtsai, 2004; Greczner és mtsai, 2010a, 2010b):

1. A hatás legyen megbízhatóan mérhető (elengedhetetlen az adatok pontossága).
2. A teszt agonista legyen stabil, penetráljon jól és oszoljon el homogénen az adott szövetben. Ez lehetővé teszi, hogy koncentrációja pontosan számolható legyen az agonista támadáspontján, vagyis a receptorok közvetlen környezetében.
3. A  $c_{bias}$  nem változhat a második E/c görbe felvétele alatt.
4. Az  $E_{bias}$  (a  $c_{bias}$  által kiváltott hatás) a teszt agonista torzítatlan E/c görbéjén – logaritmikus x tengely mellett – essen az alsó és felső görbület közötti kvázi lineáris szakaszra. Ez nem szigorú feltétel, de az RRM ekkor a legpontosabb (Gesztelyi és mtsai, 2004; Grençer és mtsai, 2010a, 2010b).
5. A meghatározás alatt a receptorok érzékenysége nem változhat. Mivel agonista (főleg full agonista) tartós expozíciója esetén a receptorok előbb vagy utóbb deszenzitizálódnak, az RRM lassan deszenzitizáló receptorok esetén is elsősorban az akut koncentráció-növekedés becslésére alkalmas.
6. Ha a torzító és a teszt agonista nem azonos, farmakodinámiai tulajdonságaiknak hasonlítaniuk kell egymásra. Ugyanakkor, ha a torzító agonistáénál kisebb illetve nagyobb hatáskiváltó képességű (efficacy-jű) teszt agonisták közül kell választani, a kisebb hatáskiváltó képességűt érdemes választani. A teszt agonista efficacy-jének alsó korlátját az a jelenség jelöli ki, amikor a  $c_{bias}$  jelenlétében a teszt agonista koncentráció-függő negatív hatást vált ki, ilyen E/c görbére ugyanis az RRM egyenlete nem illeszkedik (Grençer és mtsai, 2010a, 2010b).

### Példa az RRM alkalmazására: az intersticiális adenosin koncentráció változása pitvaron

#### Problémafelvetés és kísérleti körülmények

A myocardialis  $A_1$  receptorok aktivációja hozzájárul a szív ischaemiával és hypoxiával szembeni védekezéséhez, ezért az  $[Ado]_{ISF}$  emelése kardioprotektív stratégiának minősül (Headrick és mtsai, 2003, 2011, 2013). Megfelelő oxigén- és tápanyagellátás esetén a nukleozid transzport gátlása növeli az  $[Ado]_{ISF}$ -t (Deussen, 2000a, 2000b) és ezáltal kardioprotektív hatású (De Jong és mtsai, 2000). Ezzel szemben súlyos ischaemiában a nukleozid transzport gátlása inkább rontja a szív állapotát, mivel akadályozza a felhalmozódó adenosin kiju-

tását az energetikailag kimerült sejtekből és így nem engedi nőni az  $[Ado]_{ISF}$ -t (Schreieck és Richardt, 1999). A nukleozid transzport inhibitorok védő hatásának kialakulását illetve várható intenzitását illetően tehát fontos információ, hogy egy adott szövetben adott körülmények között a nukleozid transzport gátlása emeli-e illetve milyen mértékben az  $[Ado]_{ISF}$ -t.

Ismert, hogy a pajzsmirigyhormonok ( $T_3$ ,  $T_4$ ) erőteljesen befolyásolják a szív működését (Nabbout és Robbins, 2010; Pantos és mtsai, 2011), emellett megváltoztatják az adenosin több enzimének és transzporterének aktivitását is (Pantos és mtsai, 2004; Carneiro-Ramos és mtsai, 2004; Smolenski és mtsai, 1995). Ebből kiindulva egy korábbi, jelen fejezetben bemutatott vizsgálatunk célja annak feltárása volt, hogy a hyperthyreosis érinti-e a cardiomyocyták nukleozid transzportját és ezen keresztül befolyásolja-e a nukleozid transzport gátlás  $[Ado]_{ISF}$ -re kifejtett hatását (Karsai és mtsai, 2007). Vizsgálatunk során ezért meghatároztuk az  $[Ado]_{ISF}$  változását 10  $\mu$ M NBTI (szelektív ENT1 gátló) jelenlétében bal pitvarokon, melyeket 8 napig oldószerekkel illetve tiroxin-kezelt tengerimalacokból izoláltunk.

A jelenleg elfogadott módszerekkel a szívben a nyugalmi  $[Ado]_{ISF}$ -t elég tág határok között becslik (I. táblázat), és a tapasztalható erős módszerfüggés megjelenik az ENT1 gátlók okozta  $[Ado]_{ISF}$  változásra kapott eredményekben is (II. táblázat). Ezt a bizonytalanságot kiküszöbölendő vizsgálatunk során saját módszerünket, az RRM-et alkalmaztuk. Az RRM segítségével az  $[Ado]_{ISF}$  a szív-izom védelme szempontjából legfontosabb kompartmentben, a sejtfelszíni  $A_1$  receptorok környezetében mérhető.

A pitvarokat Krebs oldattal feltöltött izolált szervi kádakban helyeztük el, a továbbiakban a Krebs oldathoz mértük hozzá a használt vegyületeket. A torzító agonista koncentráció ( $c_{bias}$ ) az NBTI hatására kifejlődő  $[Ado]_{ISF}$  változás volt. (Mivel az RRM nem tud csökkenést meghatározni, a vizsgálat során úgy derül ki a változás iránya, hogy a kontroll vagy az NBTI jelenlétében felvett E/c görbére sikerül-e illeszteni a 4. egyenletet. A kontroll E/c görbére illesztett egyenletbe az NBTI-s E/c görbe Hill paramétereit kell beírni, míg az NBTI-s E/c görbére illesztett egyenletbe a kontroll E/c görbe Hill paramétereit.) Receptorális válaszként az adenosin két markáns pitvari hatása, a negatív kronotrópia és inotrópia közül az utóbbit választottuk (ezért ingerelt bal pitvart használtunk). Kísérleteinket elvégeztük 2 IU/ml adenosin-

dezamináz jelenlétében is, mellyel az adenozin intersticiális felhalmozódásának szerepét kívánjuk igazolni az NBTI hatásában.

Mivel az adenozin több erősen kompartmentalizált enzim szubsztrátja, eloszlása inhomogén a szívben (Deussen, 2000a, 2000b). Ez nemcsak az endogén, hanem az exogén adenozin eloszlását is befolyásolja, így az élő szövetben felvett adenozin E/c görbe hatás értékeit nehéz (gyakorlatilag lehetetlen) a releváns, vagyis a receptorok közelében kialakuló adenozin koncentrációkhoz rendelni. Ebből következően nem érdemes az adenozint teszt agonistának választani, mivel az eredmény ( $c_x$ ) erősen függ a vizsgált szövet adenozint kezelő enzimeinek (és transzportereinek) aktivitásától. (Adenozin mint teszt agonista esetén jelen esetben azt az exogén adenozin koncentrációt kaptuk volna meg  $c_x$ -ként, amelyet létre kell hozni a szervkád tápfolyadékában ahhoz, hogy az ott elhelyezett pitvar  $A_1$  receptorait annyi adenozin érje el, ami a kérdéses hatást ( $E_{bias}$ ) ki tudja váltani. Az adenozin élő szövetben mutatott rövid féléletideje miatt a myocardialis  $A_1$  receptorok közelében ennél a  $c_x$ -nél lényegesen kisebb adenozin koncentrációt feltételezhetünk.)

Mivel a tengerimalac pitvari myocardium  $A_1$  típusú adenozin receptort tartalmaz (Gardner és Broadley, 1999), teszt agonistaként CPA-t ( $N^6$ -cyclopentyladenosine) használtunk, amely szelektív  $A_1$  receptor agonista (Fredholm és mtsai, 2001), és emellett lényegesen ellenállóbb az adenozint elimináló enzimekkel szemben, mint az adenozin (Pavan és Iljerman, 1998). Saját korábbi tapasztalataink szerint is a CPA vértelen tengerimalac pitvarban igen lassan bomlik (Gesztelyi és mtsai, 2004). Ebből következően, továbbá azért is, mert a CPA az adenozinnál alig nagyobb méretű molekula, a beadott CPA-tól elvárhattuk, hogy a pitvar kontraktilis válaszában stabilizálódása után gyakorlatilag azonos koncentrációban legyen jelen a szervkád Krebs oldatában és a pitvar interstitiumában. Az is fontos szempont volt, hogy az RRM során felvett két E/c görbe közötti különbséget kizárólag az  $A_1$  receptorok környezetében kialakuló adenozin koncentrációk különbsége okozza, vagyis a teszt agonista sorsát ne befolyásolja a nukleozid transzport bloká. Mivel a CPA vértelen pitvarszövetben igen lassan bomlik (Gesztelyi és mtsai, 2004), megoszlását a nukleozid transzport gátlása gyakorlatilag nem befolyásolja (szemben az adenozinnal, amelyre nézve a gyors intracelluláris elimináció állandó, a sejtek belseje felé irányuló koncentráció-grádiens tart fenn). A

CPA stabilitása azért is kedvező, mert így megbízhatóan összehasonlíthatjuk azok az eredményeket is, amelyeket eltérő enzim- illetve transzporter-aktivitású szöveteken kaptunk (pl. euthyreoid vs. hyperthyreoid állapot).

#### Az RRM követelményeinek teljesülése

Az ENT1 gátlás okozta  $[Ado]_{ISF}$  változás becslésének pontossága megkövetelte az RRM általános feltételeinek teljesülését. Ezek „Az RRM alkalmazásának feltételei” alfejezetben említettek sorrendjében:

1. Az  $A_1$  receptor stimulációja erőteljes és könnyen mérhető negatív inotróp hatást hoz létre pitvaron, ezért a kontrakciós erő detektálása kellően pontos és megbízható az  $A_1$  receptorfunkció vizsgálatára (Gesztelyi és mtsai, 2003a, 2003b, 2004). A pitvar különösen megfelel ennek a célnak, ugyanis, szemben a kamrával, itt az  $A_1$  receptor agonisták előzetes adenilcikláz aktiváció nélkül is erőteljesen csökkentik a kontrakciós erőt (Kurachi és mtsai, 1986; Belardinelli és mtsai, 1995).
2. A CPA relatíve kis molekulatömege révén jól diffundál és kellően stabil (Gesztelyi és mtsai, 2004).
3. ENT1 gátlás során úgy biztosítható a  $c_{bias}$  állandósága, hogy kivárjuk az egyensúly beállását (amit jelen esetben a kontrakciós erő stabilizálódása mutatott az NBTI beadása után).
4. Ez a feltétel előre nem ellenőrizhető, de általában nem okoz problémát, mivel a kvázi lineáris E/c görbe szakasz csaknem teljesen lefedi az adott receptor biológiai szerepe szempontjából legfontosabb koncentráció-tartományt.
5. Ha a  $c_{bias}$  hosszú ideig áll fenn a receptorok környezetében, akkor valódi deszenzitizációt hozhat létre. Az  $A_1$  receptorok azonban hosszú ideig (órákig, sőt napokig) tartó stimuláció mellett sem deszenzitizálódnak lényeges mértékben (Longabaugh és mtsai, 1989; Baker és mtsai, 2000; Mundell és Kelly, 2011), ezért az  $A_1$  receptor agonisták jól vizsgálhatók az RRM-mel.
6. Az adenozin és a CPA egyaránt teljes („full”) agonistái az  $A_1$  receptornak. Igaz, az adenozin nem szelektál az adenozin receptor típusok között (szemben az  $A_1$  receptor szelektív CPA-val), de a pitvar fő adenozin receptor típusa az  $A_1$  (Fredholm és mtsai, 2001), ami a tengerimalac pitvarra is igaz (Gardner és Broadley, 1999). Az adenozin és a CPA különbözősége miatt természetesen az  $[Ado]_{ISF}$  változásának csak a CPA



egyenértéke határozható meg az RRM-mel, de ez is hordoz számunkra hasznos információt.

A fenti irodalmi adatokat, továbbá saját megfigyeléseinket és elméleti megfontolásainkat összegezve arra a következtetésre jutottunk, hogy az  $[Ado]_{ISF}$   $A_1$  receptorok közelében fellépő akut változását az RRM informatívan jellemezheti az ekvieffektív CPA koncentrációval.

### Eredmények

Az euthyreoid tengerimalacokból izolált bal pitvaron az NBTI  $18.8 \pm 3$  nM CPA-val ekvieffektív  $[Ado]_{ISF}$  emelkedést hozott létre. Mivel adenzin-dezamináz jelenlétében az ekvieffektív CPA koncentráció kevesebb mint a felére csökkent ( $7.9 \pm 1.9$  nM), az NBTI hatása valóban az  $[Ado]_{ISF}$  növekedésére vezethető vissza (Karsai és mtsai, 2007). Ez összhangban van mások azon megfigyelésével, hogy normoxiás szívben a nettó adenzin transzport a sejtek belseje felé irányul, így a transzport gátlása növeli az extracelluláris adenzin-szintet (Deussen és mtsai, 1999; Schreieck és Richardt, 1999; De Jong és mtsai, 2000).

Hyperthyreoid pitvarokon NBTI jelenlétében a többlet  $[Ado]_{ISF}$  mintegy 2-2.5-szer több CPA-val volt ekvieffektív, mint az euthyreoid pitvarokon ( $46.5 \pm 13.7$  nM). Az NBTI mellé adott adenzin-dezamináz kevesebb mint hatodára csökkentette az ekvieffektív CPA koncentrációt ( $7.4 \pm 2.3$  nM), igazolva ezzel az  $[Ado]_{ISF}$  növekedés oki szerepét az NBTI hatásában. Ezzel munkacsoportunk elsőként mutatta ki, hogy hyperthyreoid tengerimalac pitvaron az adenzin transzport változatlan irányú, de intenzívebb, mint euthyreoid állapotban (Karsai és mtsai, 2007). A fokozott nukleozid transzport minden bizonnyal hozzájárul az adenzin hyperthyreota szíven tapasztalt csökkent hatásához (Szentmiklósi és mtsai, 1992; Gesztelyi és mtsai, 2003a, 2003b; Karsai és mtsai, 2007). Ennek mechanizmusa, hogy a fokozott inward adenzin

transzport csökkenti az esélyét az adenzin és az extracelluláris kötőhelyű adenzin receptorok találkozásának.

A vizsgálataink során kapott  $c_x$  értékek egyedülállóak abban a tekintetben, hogy a gyorsan metabolizálódó adenzin koncentrációjának nukleozid transzport gátlás okozta változását az  $A_1$  receptorok mikrokörnyezetében jellemzik. Az  $A_1$  receptorok környezete egy olyan szöveti kompartmentben, amely nagy jelentőségű a szív ischaemiához és hypoxiához való adaptációja szempontjából, ugyanakkor más módszerrel nehezen közelíthető meg. Eredményeink alapján arra lehet következtetni, hogy ENT1 blokádnál során az  $A_1$  receptorok fokozottan stimulált állapotban vannak mind eu-, mind hyperthyreoid szívben, ugyanakkor ez az aktiváció nagyobb mértékű hyperthyreoid állapotban. Ez azt jelenti, hogy bár az adenzin eredendően kisebb  $A_1$  receptor válasz kiváltására képes hyperthyreoid szívben, ENT1 gátlás révén ez a válasz jobban fokozható. Mivel az  $A_1$  receptorok és az általuk iniciált folyamatok a legtöbb specieszen (köztük tengerimalacban és emberben is) lényeges részei a szív ischaemiás és hypoxiás károsodásokkal szembeni védekezésének, az nukleozid transzport gátlók előreláthatólag szerepet kapnak majd a hyperthyreota szíven folytatott további vizsgálatokban is (Karsai és mtsai, 2007).

### Köszönetnyilvánítás

A munka anyagi háttérét a következő pályázat biztosította: TAMOP-4.2.4. A/2-11-1-2012-0001.

Nemzeti Fejlesztési Ügynökség  
www.ujjszechenyiterv.gov.hu  
06 40 638 638



MAGYARORSZÁG MEGÚJUL



A projekt az Európai Unió támogatásával, az Európai Szociális Alap társfinanszírozásával valósul meg.



## 1. Függelék

Illusztrálandó a kapcsolatot egy figyelmen kívül hagyott agonista koncentráció és a receptorok ennek jelenlétében kialakuló látszólagos válaszkészség-csökkenése között, tekintsük az alábbi példát. Ha CPA-t (stabil szintetikus adenosin analóg, az  $A_1$  adenosin receptor szelektív full agonistája) mérünk izolált tengerimalac bal pitvarhoz (gyakorlatilag) maximális inotróp választ kiváltó koncentrációban (pl.  $10 \mu\text{M}$ ), a kontrakciós erő a kiindulási érték mintegy 10%-ára csökken (ez a maradék kontrakciós erő már nem csökkenthető tovább az  $A_1$  receptorok izgatásával). Ebből következően a (kiindulási kontrakciós erőre normált) válasz

$$\frac{x - 0.1x}{x} \cdot 100\% = 90\%$$

lesz, ahol  $x$  a kiindulási kontrakciós erő,  $0.1x$  pedig a CPA által maximálisan lecsökkentett kontrakciós erő. A nyugalmi kontrakciós erő tehát legfeljebb  $0.9x$ -szel csökkenthető a pitvari  $A_1$  receptorok aktiválása révén.

És most végezzük el ezt a kísérletet úgy, hogy előzőleg a pitvarhoz mérjük egy  $A_1$  receptor agonista félhatásos dózist (pl.  $10 \text{ nM}$  CPA vagy  $10 \mu\text{M}$  adenosin, csak ez utóbbi koncentrációt folyamatosan fenn kell tartani, mivel az adenosin rövid félleletidejű az élő szövetben). Ha az így kialakult kontrakciós erőt tekintjük kiindulási értéknek (amelyik  $0.55x$  lesz, mert  $0.45x$ -et, vagyis a  $0.9x$  felét le kell vonni az  $x$ -ből), akkor az ezután beadott  $10 \mu\text{M}$  CPA hatása csak

$$\frac{0.55x - 0.1x}{0.55x} \cdot 100\% \approx 82\%$$

lesz. Fontos leszögezni, hogy a 90%-ot és a 82%-ot egyaránt maximálisan stimulált  $A_1$  receptor-populáció mellett határoztuk meg ugyanazon a szövettípuson.

A fenti jelenség alapján meg lehet határozni az elsőként beadott  $10 \text{ nM}$ -os CPA koncentrációt (illetve a  $10 \mu\text{M}$  adenosin koncentrációt, de mint  $10 \text{ nM}$  CPA-t, ld. a szövegben), mégpedig a  $10 \mu\text{M}$ -os CPA koncentrációra adott válasz csökkenéséből (90% helyett 82%).

Gyakorlati szempontból fontos, hogy az  $A_1$  receptorok deszenzitizációja lassú, órákig nem számottevő (Mundell és Kelly, 2011), így a fenti kísérletek során figyelmen kívül hagyható.

## 2. Függelék

Jellemezzük egy receptor működését egy  $Z$  kimeneti változóval, amely  $Z_{\min}$  és  $Z_{\max}$  értékek között változhat,  $Z_{\max} - Z_{\min}$  tehát a receptorfunkció teljes kapacitása. Tekintsünk egy agonistát, amelynek egy általunk bemért  $c_{\text{test}}$  koncentrációja  $Z_{\min}$ -ről  $Z_{\text{test}}$ -re növeli a  $Z$  értékét. Ekkor  $c_{\text{test}}$  jelenlétében a receptorfunkció változása  $Z_{\text{test}} - Z_{\min}$  lesz, amelyből a választ ( $E_{\text{test}}$ ) fejezzük ki a teljes működési kapacitás százalékában (százalékos hatás):

$$E_{\text{test}} = \frac{Z_{\text{test}} - Z_{\min}}{Z_{\max} - Z_{\min}} \cdot 100 (\%) \quad 5. \text{ egyenlet}$$

Vizsgáljuk meg azt az esetet, amikor úgy mérjük be a  $c_{\text{test}}$ -et, hogy a rendszer már előzőleg tartalmazta az adott agonista egy ismeretlen koncentrációját ( $c_x$ ), tehát a  $Z$  kiindulási értéke  $Z_x$  volt. Ha mind a  $c_x$ -et, mind a hatását figyelmen kívül hagyjuk, akkor a  $c_{\text{test}}$  jelenlétében kialakuló  $Z_{(x+\text{test})}$ -ből a receptorfunkció változását  $Z_{(x+\text{test})} - Z_x$  formában számoljuk és ezt nem a teljes, hanem egy  $Z_{\max} - Z_x$  kiindulási kapacitás százalékában fejezzük ki. Ez a művelet azonban egy torzult hatást ( $E_{(x+\text{test})}$ ) eredményez:

$$E_{\text{test}} = \frac{Z_{\text{test}} - Z_{\min}}{Z_{\max} - Z_{\min}} \cdot 100 \quad 6. \text{ egyenlet}$$

A  $Z_{(x+\text{test})}$  és a  $Z_x$  kifejezhetők a  $c_x + c_{\text{test}}$  és a  $c_x$  koncentrációk által kiváltott (torzítatlan) hatásokból ( $E_{(x+\text{test})}$  és  $E_x$ ):

$$E_{(x+\text{test})} = \frac{Z_{(x+\text{test})} - Z_{\min}}{Z_{\max} - Z_{\min}} \cdot 100 \quad \text{és} \quad E_x = \frac{Z_x - Z_{\min}}{Z_{\max} - Z_{\min}} \cdot 100 \quad ; \text{ ezekből:} \quad 7. \text{ egyenlet}$$

$$Z_{(x+test)} = \frac{E_{(x+test)} \cdot (Z_{\max} - Z_{\min})}{100} + Z_{\min} \quad \text{és} \quad Z_x = \frac{E_x \cdot (Z_{\max} - Z_{\min})}{100} + Z_{\min} \quad 8. \text{ egyenlet}$$

A 7. és 8. egyenletből  $Z_{(x+test)}$  és  $Z_x$  beírhatók a 6. egyenletbe:

$$E_{(x+test)}' = \frac{\frac{E_{(x+test)} \cdot (Z_{\max} - Z_{\min})}{100} + Z_{\min} - \frac{E_x \cdot (Z_{\max} - Z_{\min})}{100} - Z_{\min}}{Z_{\max} - \frac{E_x \cdot (Z_{\max} - Z_{\min})}{100} - Z_{\min}} \cdot 100$$

$$E_{(x+test)}' = \frac{E_{(x+test)} \cdot (Z_{\max} - Z_{\min}) - E_x \cdot (Z_{\max} - Z_{\min})}{(Z_{\max} - Z_{\min}) - \frac{E_x \cdot (Z_{\max} - Z_{\min})}{100}} = \frac{E_{(x+test)} - E_x}{1 - \frac{E_x}{100}}$$

$$E_{(x+test)}' = \frac{100E_{(x+test)} - 100E_x}{100 - E_x} = \frac{10000 - 100E_x - 10000 + 100E_{(x+test)}}{100 - E_x}$$

$$E_{(x+test)}' = \frac{100 \cdot (100 - E_x) - 100 \cdot (100 - E_{(x+test)})}{100 - E_x} = 100 - \frac{100 \cdot (100 - E_{(x+test)})}{100 - E_x} \quad 9. \text{ egyenlet}$$

A 9. egyenlet ekvivalens a 2. egyenlettel (azzal a két formai különbséggel, hogy itt a hatást  $E_{(x+test)}$  jelöli  $E$  helyett és a torzult hatást  $E_{(x+test)}'$  jelöli  $E'$  helyett, továbbá azzal az elvi különbséggel, hogy itt még feltételezzük a  $c_x$  és a  $c_{test}$  koncentrációk azonos agonistához való tartozását, tehát a figyelmen kívül hagyott hatást itt  $E_x$  jelöli  $E_{bias}$  helyett).

Az  $E_x$  és az  $E_{(x+test)}$  kifejezhetők az ezeket létrehozó agonista koncentrációkból  $c_x$  és  $(c_x + c_{test})$ , valamint annak a receptor modellnek a paramétereiből, amellyel le kívánjuk írni az agonista koncentráció és a hatás kapcsolatát. Ha erre a célra a Hill egyenletet (1. egyenlet) választjuk:

$$E_x = E_{\max} \cdot \frac{c_x^n}{c_x^n + EC_{50}^n} \quad \text{és} \quad E_{(x+test)} = E_{\max} \cdot \frac{(c_x + c_{test})^n}{(c_x + c_{test})^n + EC_{50}^n} \quad 10. \text{ és } 11. \text{ egyenlet}$$

Mivel a  $c_x$ -et és a  $c_{test}$ -et ugyanazon agonista koncentrációinak tekintjük, a 10. és 11. egyenletben szereplő  $E_{\max}$ ,  $EC_{50}$  és  $n$  paramétereket azonosak. A 10. és 11. egyenletből az  $E_x$  és az  $E_{(x+test)}$  beírhatók a 9. egyenletbe, így  $E_{(x+test)}'$  visszavezethető a figyelembe vett koncentrációra ( $c_{test}$ ), valamint konstans mennyiségekre ( $c_x$ ,  $E_{\max}$ ,  $EC_{50}$ ,  $n$ ):

$$E_{(x+test)}' = 100 - \frac{100 \cdot \left( 100 - E_{\max} \cdot \frac{(c_x + c_{test})^n}{(c_x + c_{test})^n + EC_{50}^n} \right)}{100 - E_{\max} \cdot \frac{c_x^n}{c_x^n + EC_{50}^n}} \quad 12. \text{ egyenlet}$$

A 12. egyenlettel lényegében a 3. egyenlethez jutottunk (annyi formai különbséggel, hogy itt a torzult hatást  $E_{(x+test)}'$  jelöli  $E'$  helyett). Fontos, hogy az egyenlet itt bemutatott verziójának használatakor a hatást mindig százalékos formában kell megadni, ahogy az 5. egyenlet is mutatja (vagyis a hatás egy tetszőleges receptorfunkció kiindulási értékhez képesti változásának a receptorfunkció kiindulási kapacitására vonatkoztatott százaléka) (Gesztesy és mtsai, 2004).

## IRODALOM

1. Albrecht-Küpper, B.E., Leineweber, K., Nell, P.G.: Puri-nergic Signal. 8(Suppl 1), 91-99 (2012).
2. Baker, S.P., Scammells, P.J., Belardinelli, L.: Br. J. Pharmacol. 130, 1156-1164 (2000).
3. Belardinelli, L., Shryock, J.C., Song, Y., Wang, D., Srinivas, M.: FASEB J. 9, 359-365 (1995).
4. Burnstock, G., Fredholm, B.B., North, R.A., Verkhatsky, A.: Acta. Physiol. (Oxf.) 199, 93-147 (2010).
5. Carneiro-Ramos, M.S., da Silva, V.B., Coutinho, M.B. Jr., Battastini, A.M., Sarkis, J.J., Barreto-Chaves, M.L.: Mol. Cell. Biochem. 265, 195-201 (2004).
6. Conant, A.R., Jarvis, S.M.: Inhibition by analogues of lidoflazine. Biochem. Pharmacol. 48, 873-880 (1994).
7. Conant, A.R., Jarvis, S.M.: Adv. Exp. Med. Biol. 309A, 415-418 (1991).
8. De Jong, J.W., De Jonge, R., Keijzer, E., Bradamante, S.: Pharmacol. Therapeut. 87, 141-149 (2000).
9. Decking, U.K., Juengling, E., Kammermeier, H.: Am. J. Physiol. 254, H1125-1132 (1988).
10. Deussen, A., Stappert, M., Schafer, S., Kelm, M.: Circulation. 99, 2041-2047 (1999).
11. Deussen, A.: Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol. 362, 351-363 (2000a).
12. Deussen, A.: Ann. Biomed. Eng. 28, 877-883 (2000b).
13. Drury, A.N., Szent-Györgyi, A.: J. Physiol. 68, 213-237 (1929).
14. Elzein, E., Zablocki, J.: Expert Opin. Investig. Drugs. 17, 1901-1910 (2008).
15. Fredholm, B.B., Iljerman, A.P., Jacobson, K.A., Klotz, K.N., Linden, J.: Pharmacol. Rev. 53, 527-552 (2001).
16. Fredholm, B.B., Iljerman, A.P., Jacobson, K.A., Linden, J., Müller, C.E.: Pharmacol. Rev. 63, 1-34 (2011).
17. Fredholm, B.B.: Exp. Cell. Res. 316, 1284-1288 (2010).
18. Gardner, N.M., Bradley, K.J.: Br. J. Pharmacol. 127, 1619-1626 (1999).
19. Gesztelyi, R., Zsuga, J., Cseppento, A., Bajza, A., Varga, A., Szabo, J.Z., Szentmiklosi, A.J.: J. Pharmacol. Sci. 91, 295-304 (2003a).
20. Gesztelyi, R., Zsuga, J., Hajdu, P., Szabo, J.Z., Cseppento, A., Szentmiklosi, A.J.: Gen. Physiol. Biophys. 22, 501-513 (2003b).
21. Gesztelyi, R., Zsuga, J., Juhasz, B., Der, P., Vecsernyes, M., Szentmiklosi, A.J.: Bull. Math. Biol. 66, 1439-1453 (2004).
22. Gesztelyi, R., Zsuga, J., Kemeny-Beke, A., Varga, B., Juhasz, B., Tosaki, A.: Arch. Hist. Exact. Sci. 66, 427-438 (2012).
23. Giraldo, J., Vivas, N.M., Vila, E., Badia, A.: Pharmacol. Ther. 95, 21-45 (2002).
24. Gorman, M.W., Wangler, R.D., Bassingthwaite, J.B., Mohrman, D.E., Wang, C.Y., Sparks, H.V.: Am. J. Physiol. 261, H901-909 (1991).
25. Grencher, M., Pinter, A., Zsuga, J., Kemeny-Beke, A., Juhasz, B., Szodoray, P., Tosaki, A., Gesztelyi, R.: Can. J. Physiol. Pharmacol. 88, 1061-1073 (2010a).
26. Grencher, M., Zsuga, J., Majoros, L., Pinter, A., Kemeny-Beke, A., Juhasz, B., Tosaki, A., Gesztelyi, R.: Can. J. Physiol. Pharmacol. 88, 1074-1083 (2010b).
27. Harrison, G.J., Willis, R.J., Headrick, J.P.: Cardiovasc. Res. 40, 74-87 (1998).
28. Headrick, J.P., Ashton, K.J., Rose'meyer, R.B., Peart, J.N.: Pharmacol. Ther. 140, 92-111 (2013).
29. Headrick, J.P., Hack, B., Ashton, K.J.: Am. J. Physiol. 285, H1797-1818 (2003).
30. Headrick, J.P., Peart, J.N., Reichelt, M.E., Haseler, L.J.: Biochim. Biophys. Acta. 1808, 1413-1428 (2011).
31. Headrick, J.P.: Clin. Exp. Pharmacol. Physiol. 23, 386-394 (1996).
32. Iljerman, A.P., Fredholm, B.B., Frenguelli, B.G., Jacobson, K.A., Linden, J., Schwabe, U., Stiles, G.L., Hills, R.: IUPHAR database. <http://www.iuphar-db.org/DATABASE/FamilyMenuForward?familyId=3> (letöltve 2013. november 28.)
33. Karsai, D., Gesztelyi, R., Zsuga, J., Jakab, A., Szendrei, L., Juhasz, B., Bak, I., Szabo, G., Lekli, I., Vecsernyes, M., Varga, E., Szentmiklosi, A.J., Tosaki, A.: Cell. Biochem. Biophys. 47, 45-52 (2007).
34. Karsai, D., Zsuga, J., Juhasz, B., Der, P., Szentmiklosi, A.J., Tosaki, A., Gesztelyi, R.: J. Cardiovasc. Pharmacol. 47, 103-109 (2006).
35. Kemeny-Beke, A., Jakab, A., Zsuga, J., Vecsernyes, M., Karsai, D., Pasztor, F., Grencher, M., Szentmiklosi, A.J., Berta, A., Gesztelyi, R.: Pharmacol. Res. 56, 124-131 (2007).
36. Kenakin, T.: J. Recept. Signal. Transduct. Res. 26, 299-327 (2006).
37. Kenakin, T.P.: A pharmacology primer: theory, applications, and methods. Elsevier Academic Press, 22-23, 35-36 (2009).
38. Kiss, Z., Pak, K., Zsuga, J., Juhasz, B., Varga, B., Szentmiklosi, A.J., Haines, D.D., Tosaki, A., Gesztelyi, R.: Gen. Physiol. Biophys. 32, 325-335 (2013).
39. Kroll, K., Deussen, A., Sweet, I.R.: Circ. Res. 71, 590-604 (1992).
40. Kurachi, Y., Nakajima, T., Sugimoto, T.: Pflügers Arch. 407, 264-274 (1986).
41. Longabaugh, J.P., Didsbury, J., Spiegel, A., Stiles, G.L.: Mol. Pharmacol. 36, 681-688 (1989).
42. Manjunath, S., Sakhare, P.M.: Indian J. Pharmacol. 41, 97-105 (2009).
43. Mohrman, D.E., Heller, L.J.: Am. J. Physiol. 259, H772-783 (1990).
44. Motulsky, H.J., Christopoulos, A.: Fitting models to biological data using linear and nonlinear regression. A practical guide to curve fitting. GraphPad Software Inc., San Diego. Online version: <http://www.graphpad.com/manuals/Prism4/RegressionBook.pdf> (2004).
45. Müller, C.E., Jacobson, K.A.: Biochim. Biophys. Acta. 1808, 1290-1308 (2011).
46. Mundell, S., Kelly, E.: Biochim. Biophys. Acta. 1808, 1319-1328 (2011).
47. Nabbout, L.A., Robbins, R.J.: Methodist DeBakey Cardiovasc. J. 6, 3-8 (2010).
48. Ninomiya, H., Otani, H., Lu, K., Uchiyama, T., Kido, M., Imamura, H.: Am. J. Physiol. 282, H1810-1820 (2002).
49. Obata, T., Kubota, S., Yamanaka, Y.: J. Pharmacol. Exp. Ther. 298, 71-76 (2001).
50. Pak, K., Papp, C., Galajda, Z., Szerafin, T., Varga, B., Juhasz, B., Haines, D., Szentmiklosi, A.J., Tosaki, A., Gesztelyi, R.: Gen. Physiol. Biophys. 2013 (in press).
51. Pantos, C., Malliopoulou, V., Varonos, D.D., Cokkinos, D.V.: Basic Res. Cardiol. 99, 101-120 (2004).
52. Pantos, C., Mourouzis, I., Cokkinos, D.V.: Heart Fail. Rev. 16, 79-96 (2011).
53. Pavan, B., Iljerman, A.P.: Biochem. Pharmacol. 56, 1625-1632 (1998).
54. Perlini, S., Khoury, E.P., Norton, G.R., Chung, E.S., Fenton, R.A., Dobson, J.G. Jr., Meyer, T.E.: Circ. Res. 83, 761-771 (1998).
55. Schenone, S., Brullo, C., Musumeci, F., Bruno, O., Botta, M.: Curr. Top. Med. Chem. 10, 878-901 (2010).
56. Schrieck, J., Richardt, G.: J. Mol. Cell Cardiol. 31, 123-134 (1999).

57. Smolenski, R.T., Yacoub, M.H., Seymour, A.M.: *Mol. Cell. Biochem.* 143, 143-149 (1995).
58. Sommerschild, H.T., Kirkeboen, K.A.: *Acta Anaesthesiol. Scand.* 44, 1038-1055 (2000).
59. Sommerschild HT, Kirkeboen, K.A.: *Acta Anaesthesiol. Scand.* 46, 123-37 (2002).
60. Stepp, D.W., Van Bibber, R., Kroll, K., Feigl, E.O.: *Circ. Res.* 79, 601-610 (1996).
61. Szentmiklosi, A.J., Cseppento, A., Harmati, G., Nanasi, P.P.: *Curr. Med. Chem.* 18, 1164-1187 (2011).
62. Szentmiklosi, A.J., Cseppento, A., Szabo, J.Z., Nosztray, K., Szegi, J.: *Pharmacol. Res.* 25(Suppl. 2), 171-172 (1992).
63. Thorn, J.A., Jarvis, S.M.: *Gen. Pharmacol.* 27, 613-620 (1996).
64. Tune, J.D., Richmond, K.N., Gorman, M.W., Feigl, E.O.: *Circulation.* 101, 2942-2948 (2000).
65. Van Wylen, D.G., Schmit, T.J., Lasley, R.D., Gingell, R.L., Mentzer, R.M. Jr.: *Am. J. Physiol.* 262, H1934-1938 (1992).
66. Wangler, R.D., Gorman, M.W., Wang, C.Y., DeWitt, D.F., Chan, I.S., Bassingthwaighite, J.B., Sparks, H.V.: *Am. J. Physiol.* 257, H89-106 (1989).
67. WHO (World Health Organization), Global Health Observatory: [http://www.who.int/gho/mortality\\_burden\\_disease/causes\\_death\\_2008/en/index.html](http://www.who.int/gho/mortality_burden_disease/causes_death_2008/en/index.html) (a felső oszlopdiagramm alatti „View date”-re klikkelve tölthető le az az Exel file, melynek adataiból az 1. ábra kördiagrammjai készültek; letöltve 2012. augusztus 21.)
68. Wilbur, S.L., Marchlinski, F.E.: *Am. J. Cardiol.* 79, 30-37 (1997).
69. Zhu, Q., Matherne, G.P., Curnish, R.R., Tribble, C.G., Berne, R.M.: *Am. J. Physiol.* 263, H1322-1326 (1992).
70. Zhu, Q.Y., Headrick, J.P., Berne, R.M.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 88, 657-660 (1991).

Érkezett: 2014. március 4.

---



## **FELHÍVÁS**

### **ACTA PHARMACEUTICA HUNGARICA**

### **ELŐFIZETÉSRE**

Tájékoztatjuk kedves Kollégáinkat, hogy

- az Acta Pharmaceutica Hungarica c. folyóiratra 2013-ban előfizetéssel rendelkezők a 2014. évre vonatkozó számlát január közepéig megkapták;
- az Acta Pharmaceutica Hungarica c. folyóirat 2014. évi előfizetési díja 6000 Ft + 5% áfa, egy példány ára: 1500 Ft + 5% áfa.

Kérjük, hogy az előfizetői adatokban történt változásokat juttassák el Polonyi Adrienn részére (tagdij@mgyt.hu; fax: 266-9433, 483-1465; levelezési cím: Magyar Gyógyszerésztudományi Társaság, 1085 Budapest, Gyulai Pál u. 16.)

**Új előfizetésekre is van lehetőség. Előfizetési igényeiket juttassák el Polonyi Adrienn részére (tagdij@mgyt.hu; fax: 266-9433, 483-1465; levelezési cím: Magyar Gyógyszerésztudományi Társaság, 1085 Budapest, Gyulai Pál u. 16.)**

## Szerzői útmutató

Az *Acta Pharmaceutica Hungarica* a gyógyszerészeti tudományok területéről közöl eredeti, kísérletes kutatómunka eredményeit bemutató közleményeket, de fórumot biztosít összefoglaló és nem kísérletes (történeti, szervezési) tanulmányok, valamint Ph.D. és D.Sc. értekezések téziseinek közlésére is.

Hazai kutatóhelyek vagy olyan szerzői kollektívák magyar nyelvű kéziratait közöljük, ahol az első szerző magyar. Lehetőség van külföldi folyóiratban már megjelent, kiemelkedő jelentőségű közlemények magyar nyelvű változatának közlésére is, az első megjelenés időpontjától számított egy éven belül, az első közlés bibliográfiai adatainak megjelölésével.

### Közlésre elfogadunk:

1. *Összegyűjtő közleményeket*, legfeljebb 25 gépelt oldal terjedelemben. Ezek megírására általában a szerkesztőbizottság felkérésére kerülhet sor, illetve az erre irányuló szándékot célszerű előzetesen egyeztetni a szerkesztőbizottsággal.

2. *Közleményeket*, legfeljebb 12 gépelt oldal terjedelemben. Az ábrák és táblázatok együttes száma maximálisan 10 lehet.

3. *Rövid közleményeket*, legfeljebb 4 gépelt oldal terjedelemben (összesen legfeljebb 4 ábra és táblázat). A közlemények megjelenési sorrendjében a rövid közlemények előnyt élveznek.

4. *Ph.D. értekezések összefoglaló közleményét*, legfeljebb 25 oldal terjedelemben.

Felelősen nagy terjedelmű dolgozatok esetében a szerkesztőbizottság fenntartja magának a jogot arra, hogy a lektori javaslatok alapján a szerzőt felkérje dolgozatának rövid közleménnyé való átdolgozására.

### A kézirat elkészítésének módja:

#### a) Általános szempontok

A kéziratot elektronikusan, csatolt file-ként kell a felelős szerkesztő e-mail címére elküldeni: zelrom@gytk.sote.hu

A táblázatokat külön file-ként, címmel és római sorszámmal ellátva készítsük.

Az ábrák és egyéb illusztrációk olyan színvonalon készüljenek, hogy azok nyomdai szerkesztésre alkalmasak legyenek. Az ábrákat külön file-ként kell csatolni, az elnevezésben az ábraszámokat fel kell tüntetni. Javasolt formátum: jpg, tiff.

Az irodalmi hivatkozásokat külön, a hivatkozások sorrendjében közöljük. A hivatkozási számot a szövegben tegyük szögletes zárójelbe.

A hivatkozások módja:

Folyóiratcikk:

1. Revelle, L. K., Musser, S. M., Rowe, B. J., Feldmann, I. C.: J. Pharm. Sci. 86, 631-634 (1997)

Szakkönyv:

2. Gyarmati L., Rác L., Plachy J., Csontos A.: A gyógyszer-technológia és biofarmácia kémiai ellenőrző módszerei. Medicina, Budapest, 1982. 147-152. old.

Könyvfejezet:

3. Ariens, E. J.: Racemates – an impediment in the use of drugs and agrochemicals. In: Krstulovic, A.M. (ed): Chiral Separations by HPLC. Ellis Horwood, Chichester, 1989. pp. 31–68.

Szabadalom:

4. U.S. Pat. 3 425 422 (1984)

Konferencia-előadás:

5. Duncan, R.: Polymer therapeutics: Targeting drugs and genes to tumours. 6<sup>th</sup> European Congress of Pharmaceutical Sciences. Eur. J. Pharm. Sci. 11, (2000) S1-S2.

Internetes hivatkozás: teljes URL-cím a keresőablakból kimásvolva és az elérés dátuma az alábbiak szerint:

6. <http://www.eum.hu/main.php?folderID=3746&objectID=6000268> [2008. 08. 05.] Az Egészségügyi Minisztérium szakmai protokollja - Gyógyszeres fájdalomcsillapítás és gyulladásgátlás a reumatológiai betegségekben.

Az idegen orvosi kifejezések helyesírásában Fábíán P. és Magasi P.: Orvosi helyesírási szótár. Akadémiai Kiadó, 1992. legyen az irányadó, a kémiai kifejezések nevezéktanára és helyesírására vonatkozóan pedig Erdély-Grúz T. és Csányi P.: A kémiai elnevezés és helyesírás szabályai. Akadémiai Kiadó, 1972.; F. Csányi P., Fábíán P. és Hőnyi E.: Kémiai helyesírási szótár. Műszaki Kiadó, 1982.; valamint F. Csányi P. és Simándi L.: Szeretlen kémiai nevezéktan. Magyar Kémikusok Egyesülete, 1995.

A mértékegységek megjelölésében az SI-mértérendszer szabályai az irányadók.

#### b) A kézirat felépítése

A kézirat szerkesztéséhez a következő beosztást kérjük:

A *dolgozat címe* (esetleg alcíme).

A *szerző(k) teljes neve* (tudományos fokozatok nélkül), a szerkesztőséggel kapcsolatot tartó szerző neve csillaggal megjelölve.

A szerző(k) *munkahelye* teljes postai címmel, valamint a *levelező szerző e-mail címe*.

A *dolgozat magyar nyelvű összefoglalása*.

A magyar nyelvű összefoglalás terjedelme a dolgozat hosszától függően 10-20 sor legyen és az általános megfogalmazások kerülésével tartalmazza a dolgozat legfontosabb, konkrét megállapításait.

**Kulcsszavak:** A dolgozat tartalmára utaló, maximum 5 kulcsszó megadása.

A dolgozat *címe angol nyelven*, a szerző(k) neve (keresztnevek rövidítve).

**Angol nyelvű összefoglalás.**

**Bevezetés**, amely tartalmazza a munka célkitűzéseit, valamint a vizsgálatok előzményeiből és irodalmi háttéréből annyit, amennyi a dolgozat megértéséhez és értékeléséhez szükséges.

**Key-words:** A dolgozat tartalmára utaló, maximum 5 kulcsszó angol nyelvű fordítása.

**Kísérleti rész**, amely tartalmazza a felhasznált eszközök és anyagok, valamint a kidolgozott módszerek pontos leírását.

**Eredmények.**

A dolgozatok csak a leírt módszerek teljesítőképességét megfelelően dokumentáló adatokkal fogadhatók el. Ezek megadásánál használjuk a matematikai statisztika korszerű módszereit.

**Az eredmények értékelése.**

**Ábracímek.**

**Következtetések.** Az utóbbi két fejezet összevonható az Eredmények c. fejezettel.

Az esetleges **köszönetnyilvánítások.**

**Irodalomjegyzék.**